

NUCLEIC ACID-ADSORBING POROUS MEMBRANE FOR SEPARATING AND PURIFYING NUCLEIC ACID AND APPARATUS FOR SEPARATING AND PURIFYING NUCLEIC ACID

Publication number: JP2005192558 (A)

Publication date: 2005-07-21

Inventor(s): MAKINO YOSHIHIKO; MORI TOSHIHIRO; SAKAINO YOSHIKI +

Applicant(s): FUJI PHOTO FILM CO LTD +

Classification:

- international: **C12N15/09; B01D69/06; B01D69/10; B01D71/16; B01J20/26; C12M1/00; C12N15/09; B01D69/00; B01D71/00; B01J20/22; C12M1/00; (IPC1-7): C12N15/09; B01D69/06; B01D69/10; B01D71/16; B01J20/26; C12M1/00**

- European:

Application number: JP20040300516 20041014

Priority number(s): JP20040300516 20041014; JP20030359900 20031020; JP20030410637 20031209

Abstract of JP 2005192558 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a nucleic acid-adsorbing porous membrane which has an excellent separating ability, which provides a good washing efficiency, which permits convenient and expeditious procedures, which is adapted for automation and reduction in size, which can be mass produced with substantially identical separating capability, and which is adapted for a method of separating and purifying nucleic acids and to provide apparatus using the same. ; **SOLUTION:** A nucleic acid-adsorbing solid phase for separating and purifying a nucleic acid comprises use of the nucleic acid-adsorbing porous membrane for use in the method for separation and purification of the nucleic acid, the method comprising the steps, of (1) adsorbing the nucleic acid to the solid phase by allowing a sample solution containing the nucleic acid to come into contact with the nucleic acid-adsorbing solid phase, (2) washing the solid phase by allowing a washing solution to come into contact with the solid phase while the nucleic acid is adsorbed to the solid phase, and (3) desorbing the nucleic acid from the solid phase by allowing a recovering solution to come into contact with the solid phase. ; **COPYRIGHT:** (C)2005,JPO&NCIPI

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-192558

(P2005-192558A)

(43) 公開日 平成17年7月21日 (2005.7.21)

(51) Int. Cl.⁷

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

4 B O 2 4

B O 1 D 69/06

B O 1 D 69/06

4 B O 2 9

B O 1 D 69/10

B O 1 D 69/10

4 D O O 6

B O 1 D 71/16

B O 1 D 71/16

4 G O 6 6

B O 1 J 20/26

B O 1 J 20/26

H

審査請求 有 請求項の数 50 O L (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-300516 (P2004-300516)

(71) 出願人 000005201

(22) 出願日 平成16年10月14日 (2004.10.14)

富士写真フイルム株式会社

(31) 優先権主張番号 特願2003-359900 (P2003-359900)

神奈川県南足柄市中沼210番地

(32) 優先日 平成15年10月20日 (2003.10.20)

(74) 代理人 100105647

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

弁理士 小栗 昌平

(31) 優先権主張番号 特願2003-410637 (P2003-410637)

(74) 代理人 100105474

(32) 優先日 平成15年12月9日 (2003.12.9)

弁理士 本多 弘徳

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(74) 代理人 100108589

弁理士 市川 利光

(74) 代理人 100115107

弁理士 高松 猛

(74) 代理人 100090343

弁理士 濱田 百合子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分離精製用の核酸吸着性多孔性膜及び核酸分離精製装置

(57) 【要約】

【課題】分離性能に優れ、洗浄効率が良く、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である核酸の分離精製方法に適した核酸吸着性多孔性膜及びそれを用いる装置を提供する。

【解決手段】(1) 核酸を含む試料溶液を核酸吸着性固相に接触させて、該固相に核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性固相に接触させて、核酸が吸着した状態で該固相を洗浄する工程、及び(3) 回収液を該核酸吸着性固相に接触させて、該固相内から核酸を脱着させる工程を含有する核酸の分離精製方法に用いるための核酸吸着性固相であって、該固相が核酸を吸着する多孔性膜であることを特徴とする核酸分離精製用の核酸吸着性多孔性膜。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 核酸を含む試料溶液を核酸吸着性固相に接触させて、該固相に核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性固相に接触させて、核酸が吸着した状態で該固相を洗浄する工程、及び(3) 回収液を該核酸吸着性固相に接触させて、該固相内から核酸を脱着させる工程を含有する核酸の分離精製方法に用いるための核酸吸着性固相であつて、該固相が核酸を吸着する多孔性膜であることを特徴とする核酸分離精製の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 2】

厚さが $10 \mu\text{m} \sim 500 \mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項 1 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

10

【請求項 3】

平均孔径が $0.9 \sim 5.0 \mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項 1～2 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 4】

多孔性膜が表裏非対称性であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 5】

最大孔径と最小孔径の比が 2 以上であることを特徴とする請求項 4 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 6】

隙率が $50 \sim 95\%$ であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

20

【請求項 7】

バブルポイントが $0.1 \sim 10 \text{ kgf/cm}^2$ であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 8】

圧力損失が $0.1 \sim 100 \text{ kPa}$ であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 9】

25°C で 1 kg/cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜 1 cm^2 あたり 1 分間で $1 \sim 5000 \text{ mL}$ であることを特徴とする請求項 1～8 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

30

【請求項 10】

多孔性膜 1 mg あたりの核酸の吸着量が $0.1 \mu\text{g}$ 以上であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 11】

多孔性膜が、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着することを特徴とする請求項 1～10 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 12】

イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜が、多糖構造を有する有機高分子から成ることを特徴とする請求項 11 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

40

【請求項 13】

多糖構造を有する有機高分子から成る核酸吸着性多孔性膜が、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物である請求項 12 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 14】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物である請求項 13 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 15】

トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比（質量比）が $99:1 \sim 1:99$ である請求項 14 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

50

【請求項 16】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である請求項 13 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 17】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である請求項 13 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 18】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である請求項 13 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

10

【請求項 19】

多糖構造を有する有機高分子から成る多孔性膜が、アセチルセルロースを酸処理した有機材料からなる多孔性膜である請求項 12 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 20】

アセチルセルロースの酸化率が 5% 以上であることを特徴とする請求項 19 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 21】

アセチルセルロースを酸処理した有機材料からなる多孔性膜が、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した有機材料からなる多孔性膜である請求項 20 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

20

【請求項 22】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物の酸化率が 5% 以上であることを特徴とする請求項 21 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 23】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した有機材料が、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物の酸化物であることを特徴とする請求項 23 または 24 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 24】

トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比（質量比）が 99 : 1 ~ 1 : 99 である請求項 23 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

30

【請求項 25】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した有機材料が、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の酸化物である請求項 21 または 22 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 26】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した有機材料が、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の酸化物である請求項 21 または 22 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 27】

アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した有機高分子が、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の酸化物である請求項 21 または 22 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

40

【請求項 28】

酸処理の前に比べて、酸処理の後で平均孔径が減少していることを特徴とする、請求項 19 ~ 27 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 29】

酸処理の前に対する酸処理後の平均孔径の比が、0.8 以下の多孔性膜である請求項 28 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 30】

多糖構造を有する有機高分子から成る核酸吸着性多孔性膜が再生セルロースであること

50

を特徴とする請求項 12 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 31】

イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜である請求項 11 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 32】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜の処理が、多孔性膜に、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有するグラフトポリマー鎖を結合することである、請求項 31 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 33】

イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を持つ材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜である請求項 11 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 34】

親水基を持つ材料が、ポリマー鎖または側鎖に親水基を有する有機ポリマーである、請求項 33 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 35】

イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である請求項 11 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 36】

イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜である請求項 11 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 37】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜への親水基の導入処理が、多孔性膜に、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有するグラフトポリマー鎖を結合することにより行うものである請求項 36 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 38】

イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を、親水基を持つ材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜である請求項 11 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 39】

親水基を持つ材料が、ポリマー鎖または側鎖に親水基を有する有機ポリマーである、請求項 38 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 40】

親水基が水酸基であることを特徴とする請求項 31～39 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 41】

上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させる核酸分離精製方法に用いることを特徴とする請求項 1～40 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 42】

上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二個の開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させる核酸分離精製方法に用いることを特徴とする請求項 41 に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【請求項 43】

10

20

30

40

50

容器内に、請求項 1～42 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜を收容した少なくとも二個の開口を有する核酸分離精製カートリッジ。

【請求項 44】

核酸分離精製カートリッジの一の開口に、圧力発生装置であるポンプを着脱可能に結合させて用いることを特徴とする請求項 43 に記載の核酸分離精製カートリッジ。

【請求項 45】

請求項 1～42 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜を用いる、核酸分離精製カートリッジ及び試薬のキット。

【請求項 46】

請求項 1～42 のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜を用いる核酸分離精製装置。

10

【請求項 47】

核酸吸着性多孔性膜を備えた核酸分離精製カートリッジを用い、該核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入し加圧して該試料液中の核酸を前記核酸吸着性多孔性膜に吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して、核酸吸着性多孔性膜に核酸が吸着した状態で、核酸以外の成分を除去後、前記核酸分離精製カートリッジに回収液を分注し加圧して核酸吸着性多孔性膜に吸着した核酸を脱着して回収液とともに回収する核酸分離精製工程を自動的に行う自動装置であって、前記核酸分離精製カートリッジ、前記試料液および洗浄液の排出液を收容する廃液容器および前記核酸を含む回収液を收容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジに加圧エアーを導入する加圧エアー供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収液を分注する分注機構とを備えてなることを特徴とする、請求項 46 に記載の核酸分離精製装置。

20

【請求項 48】

前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、該スタンドに上下移動可能に支持され前記核酸分離精製カートリッジを保持するカートリッジホルダーと、該カートリッジホルダーの下方で前記核酸分離精製カートリッジに対する位置を交換可能に前記廃液容器および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなることを特徴とする請求項 47 に記載の核酸分離精製装置。

【請求項 49】

前記加圧エアー供給機構は、下端部より加圧エアーを噴出するエアーノズルと、該エアーノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された前記核酸分離精製カートリッジに対し前記エアーノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、該加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えてなることを特徴とする請求項 47 または 48 に記載の核酸分離精製装置。

30

【請求項 50】

前記分注機構は、前記洗浄液を分注する洗浄液分注ノズルと、前記回収液を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄液分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジ上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液を收容した洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液を收容した回収液ボトルより回収液を吸引し前記回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなることを特徴とする請求項 47～49 のいずれかに記載の核酸分離精製装置。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸の分離精製に用いる核酸吸着性多孔性膜及びそれを用いた核酸分離精製装置に関する。より好ましくは、核酸を含む試料溶液を用いて、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を收容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む試料から核酸を分離精製するための核酸吸着性多孔性膜及び当該核酸分離精製装置に関する。

50

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることが要求される。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

10

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるといった危険性も加わる。

【0005】

広く知られた分離精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、引き続く洗浄、脱着等の操作によって分離精製する方法がある（例えば、特許文献1）。この方法は、分離性能としては優れているが、簡便性、迅速性、自動化および小型化適性においては十分でなく、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。

20

【0006】

また、簡便かつ効率よく核酸を分離精製する方法の一つとして、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させることによって、核酸を分離精製する方法が記載されている（特許文献2）。

【0007】

一方、従来の核酸分離精製法としては、遠心法によるもの、磁気ビーズを用いるもの、フィルターを用いるものなどがある。例えば、フィルターを用いた核酸分離装置としては、フィルターを収容したフィルターチューブをラックに多数セットし、これに核酸を含む試料液を分注し、上記ラックの底部の周囲をシール材を介してエアチャンバーで密閉して内部を減圧し、全フィルターチューブを同時に排出側より吸引し試料液を通過させて核酸をフィルターに吸着し、その後、洗浄液および回収液を分注して、同様に減圧吸引して洗浄・脱着するようにした機構が提案されている（例えば、特許文献3参照）。

30

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【特許文献2】特開2003-128691号公報

【特許文献3】特許第2832586号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0008】

しかしながら、従来の核酸分離方法では、収率や純度の点で未だ充分ではなく、更なる改良が求められる。また、従来の自動装置は、装置が大型で多量の検体を分析するのには適するものの、検体数が少なく分析頻度の少ない場合には、高価で不向きであるとともに、処理効率が低くなる問題を有する。特に、採取全血のように各試料液の特性が異なる場合に、特許文献3のように全体を同時に吸引するものでは、一部のフィルターチューブの吸引が終了してその抵抗がなくなると、他のフィルターチューブに作用する減圧が小さくなって粘度の高い試料液の処理が終了しない場合が生じる。その減圧容量を増大することは装置の小型化を図る際の障害となり、減圧容量が大きいために減圧を作用させるまでの時間が掛かり、また、液が全部排出されたことの検出が困難で、時間設定が長く、処理効

50

率の向上の障害となる。また、粘度の低い試料液では、フィルターチューブより勢いよく液が排出されて、泡状の飛沫が隣接するフィルターチューブおよびラックに付着してコンタミネーションを生じ、精度低下を招く問題がある。

【0009】

従って、本発明の目的は、検体中の核酸を収率及び純度良く分離精製するに適した核酸吸着性の固相を提供することである。

本発明の更なる目的は、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能な核酸分離方法に適した核酸吸着性の固相を提供することである。

本発明の他の目的は、短時間で効率よくコンタミネーションが発生しないように処理でき、かつ、小型化が可能な核酸分離精製装置を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、核酸の分離精製方法において、核酸を多孔性膜に吸着及び脱着させる過程を含むことが有効であることが分かった。従って、本発明は、当該方法に適した核酸吸着性多孔膜を提供するものである。本発明では、特に、核酸の分離精製方法において、該多孔性膜としてイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜を用いることによって、核酸を含む検体から核酸を収率よく、高純度で分離精製することができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明は、下記の構成よりなるものである。

【0011】

1. (1)核酸を含む試料溶液を核酸吸着性固相に接触させて、該固相に核酸を吸着させる工程、(2)洗浄液を該核酸吸着性固相に接触させて、核酸が吸着した状態で該固相を洗浄する工程、及び(3)回収液を該核酸吸着性固相に接触させて、該固相内から核酸を脱着させる工程を含有する核酸の分離精製方法に用いるための核酸吸着性固相であって、該固相が核酸を吸着する多孔性膜であることを特徴とする核酸分離精製の核酸吸着性多孔性膜。

【0012】

2. 厚さが $10\mu\text{m} \sim 500\mu\text{m}$ であることを特徴とする上記第1項に記載の核酸吸着性多孔性膜。
3. 平均孔径が $0.9 \sim 5.0\mu\text{m}$ であることを特徴とする上記第1～5項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。
4. 多孔性膜が表裏非対称性であることを特徴とする上記第1～3項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。
5. 最大孔径と最小孔径の比が2以上であることを特徴とする上記第4項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【0013】

6. 隙率が $50 \sim 95\%$ であることを特徴とする上記第1～5項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。
7. パブルポイントが $0.1 \sim 10\text{kgf/cm}^2$ であることを特徴とする上記第1～6項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。
8. 圧力損失が $0.1 \sim 100\text{kPa}$ であることを特徴とする上記第1～7項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【0014】

9. 25°C で 1kg/cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜 1cm^2 あたり1分間で $1 \sim 5000\text{mL}$ であることを特徴とする上記第1～8項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。
10. 多孔性膜 1mg あたりの核酸の吸着量が $0.1\mu\text{g}$ 以上であることを特徴とする上記第1～9項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【0015】

11. 多孔性膜が、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着することを特徴とする上記第1～10項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

12. イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜が、多糖構造を有する有機高分子から成ることを特徴とする上記第11項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

13. 多糖構造を有する有機高分子から成る核酸吸着性多孔性膜が、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物である上記第12項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

14. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物である上記第13項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

15. トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比(質量比)が99:1～1:99である上記第14項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

16. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である上記第13項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

17. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である上記第13項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

18. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物がジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物である上記第13項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【0016】

19. 多糖構造を有する有機高分子から成る多孔性膜が、アセチルセルロースを酸化した有機材料からなる多孔性膜である上記第12項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

20. アセチルセルロースの酸化する率が5%以上であることを特徴とする上記第19項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

21. アセチルセルロースを酸化した有機材料からなる多孔性膜が、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化した有機材料からなる多孔性膜である上記第20項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

22. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物の酸化する率が5%以上であることを特徴とする上記第21項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

23. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化した有機材料が、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物の酸化物であることを特徴とする上記第21または22項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

24. トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比(質量比)が99:1～1:99である上記第23項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

25. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化した有機材料が、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の酸化物である上記第21または22項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

26. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化した有機材料が、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の酸化物である上記第21または22項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

27. アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化した有機高分子が、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物の酸化物である上記第21または22項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

28. 酸化する前に比べて、酸化した後で平均孔径が減少していることを特徴とする、上記第19～27項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

29. 酸化する前に対する酸化した後の平均孔径の比が、0.8以下の多孔性膜である上記第28項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【0017】

30. 多糖構造を有する有機高分子から成る核酸吸着性多孔性膜が再生セルロースであることを特徴とする上記第12項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

3 1 . イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜である上記第 1 1 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

3 2 . 親水基を持たない有機材料の多孔性膜の処理が、多性膜に、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有すグラフトポリマー鎖を結合することである、上記第 3 1 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

3 3 . イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を持つ材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜である上記第 1 1 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

3 4 . 親水基を持つ材料が、ポリマー鎖または側鎖に親水基を有する有機ポリマーである、上記第 3 3 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【 0 0 1 9 】

3 5 . イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である上記第 1 1 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

3 6 . イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜である上記第 1 1 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

3 7 . 親水基を持たない無機材料の多孔性膜への親水基の導入処理が、多孔性膜に、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有すグラフトポリマー鎖を結合することにより行うものである上記第 3 6 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

3 8 . イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する核酸吸着性多孔性膜が、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を、親水基を持つ材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜である上記第 1 1 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

3 9 . 親水基を持つ材料が、ポリマー鎖または側鎖に親水基を有する有機ポリマーである、上記第 3 8 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【 0 0 2 0 】

4 0 . 親水基が水酸基であることを特徴とする上記第 3 1 ~ 3 9 項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【 0 0 2 1 】

4 1 . 上記 (1)、(2) 及び (3) の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させる核酸分離精製方法に用いることを特徴とする上記第 1 ~ 4 0 項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

4 2 . 上記 (1)、(2) 及び (3) の各工程において、少なくとも二つの開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させる核酸分離精製方法に用いることを特徴とする上記第 4 1 項に記載の核酸吸着性多孔性膜。

【 0 0 2 2 】

4 3 . 容器内に、上記第 1 ~ 4 2 項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜を収容した少なくとも二つの開口を有する核酸分離精製カートリッジ。

4 4 . 核酸分離精製カートリッジの一の開口に、圧力発生装置であるポンプを着脱可能に結合させて用いることを特徴とする上記第 4 3 項に記載の核酸分離精製カートリッジ。

4 5 . 上記第 1 ~ 4 2 項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜を用いる、核酸分離精製カートリッジ及び試薬のキット。

【 0 0 2 3 】

4 6 . 上記第 1 ~ 4 2 項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜を用いる核酸分離精製装置。

10

20

30

40

50

47. 核酸吸着性多孔性膜を備えた核酸分離精製カートリッジを用い、該核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入し加圧して該試料液中の核酸を前記核酸吸着性多孔性膜に吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して、核酸吸着性多孔性膜に核酸が吸着した状態で、核酸以外の成分を除去後、前記核酸分離精製カートリッジに回収液を分注し加圧して核酸吸着性多孔性膜に吸着した核酸を脱着して回収液とともに回収する核酸分離精製工程を自動的に行う自動装置であって、前記核酸分離精製カートリッジ、前記試料液および洗浄液の排出液を收容する廃液容器および前記核酸を含む回収液を收容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収液を分注する分注機構とを備えてなることを特徴とする、上記第46項に記載の核酸分離精製装置。

10

48. 前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、該スタンドに上下移動可能に支持され前記核酸分離精製カートリッジを保持するカートリッジホルダーと、該カートリッジホルダーの下で前記核酸分離精製カートリッジに対する位置を交換可能に前記廃液容器および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなることを特徴とする上記第47項に記載の核酸分離精製装置。

【0024】

49. 前記加圧エア供給機構は、下端部より加圧エアを噴出するエアノズルと、該エアノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された前記核酸分離精製カートリッジに対し前記エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、該加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えてなることを特徴とする上記第47または48項に記載の核酸分離精製装置。

20

50. 前記分注機構は、前記洗浄液を分注する洗浄液分注ノズルと、前記回収液を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄液分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジ上に順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液を收容した洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液を收容した回収液ボトルより回収液を吸引し前記回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなることを特徴とする上記第47～49項のいずれかに記載の核酸分離精製装置。

【発明の効果】

30

【0025】

本発明の核酸吸着性多孔性膜を用いることにより、効率良く、高純度で、検体中の核酸を核酸吸着性の多孔性膜に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製することができる。更には、本発明の核酸吸着性多孔性膜を用いて核酸を分離精製する方法は、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である。

更に、本発明によれば、短時間で効率よくコンタミネーションが発生しないように処理でき、かつ、小型化が可能な、核酸分離精製装置を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

40

本発明の核酸吸着性多孔性膜を用いる核酸分離精製方法は、(1)核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(2)該核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、及び(3)回収液を、該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程を少なくとも含むものである。

【0027】

好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させるものであり、より好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二個の開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を收容した核酸分離精製カートリッジの開口に、核酸を含む試料溶液

50

、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させるものである。核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を加圧状態で上記多孔性膜に通過させることにより、装置をコンパクトに自動化することができ、好ましい。加圧は、好ましくは10～200kpa、より好ましくは40～100kpaの程度で行われる。

【0028】

上記の核酸分離精製の工程では、最初の核酸を含む試料液を注入から核酸分離精製カートリッジ外に核酸を得るまでの工程を10分以内、好適な状況では2分以内で終了することが可能である。また、上記の核酸分精製の工程では核酸を検体中に含まれる全量に対して50質量%以上、好適な状況では90質量%以上の収率で得る事が可能である。

10

【0029】

また、上記の核酸分精製の工程では、1kbpから200kbp、特に20kbpから140kbpと広範囲に及ぶ分子量の核酸を回収することができ、すなわち、従来行なわれているガラスフィルターを用いたスピンカラム法に比べて、長鎖の核酸を回収できる。

【0030】

また、上記の核酸分精製の工程では、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)が、DNAの場合は1.6～2.0、RNAの場合は1.8～2.2となる純度を持つ核酸を回収することができ、不純物混入量の少ない高純度の核酸を定量的に得ることができ、さらには、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)がDNAの場合は1.8付近、RNAの場合は2.0付近となる純度を持つ核酸を回収することができ、

20

【0031】

また、上記工程において、圧力差発生装置としては、注射器、ピペット、あるいはペリスタポンプのような加圧が可能なポンプ等、或いは、エバポレーター等の減圧可能なものが挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペットは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されている。

【0032】

本発明において使用できる検体に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物(又はその一部)、動物(またはその一部)、細菌、ウイルス、培養細胞など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

30

【0033】

最初にこれらの検体について細胞膜および核膜等を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液(核酸可溶化試薬)で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散し、核酸を含む試料溶液を得る。

【0034】

細胞膜および核膜を溶解して、核酸を可溶化するためには、例えば、対象となる試料が全血の場合、赤血球の除去、(2)各種タンパク質の除去、及び(3)白血球の溶解及び核膜の溶解が必要となる。赤血球の除去および(2)各種タンパク質の除去は、膜への非特異吸着および多孔性膜の目詰まりを防ぐために、(3)白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化させるためにそれぞれ必要となる。特に、(3)白血球の溶解及び核膜の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程により核酸を可溶化することが必要である。

40

【0035】

核酸を含む検体は、単一の核酸を含む検体でもよいし、異なる複数種類の核酸を含む検体でもよい。回収する核酸の種類は、DNAまたはRNA、一本鎖または二本鎖、直鎖状または環状等、特に制限されない。検体の数は一つでも複数(複数の容器を用いての複数

50

の検体の並列処理)であってもよい。回収する核酸の長さも特に限定されず、例えば、数**b p**~数**M b p**の任意の長さの核酸を使用することができる。取扱い上の観点からは、回収する核酸の長さは一般的には、数**b p**~数百**k b p**程度である。本発明の核酸分離精製方法は、従来の簡易的な核酸分離精製方法より比較的長い核酸を迅速に取り出すことができる、好ましくは**50 k b p**以上、より好ましくは**70 k b p**、更に好ましくは**100 k b p**以上の核酸を回収することに用いることができる。撹拌及びビベッティングを穏やかにすることが、より長いDNAを回収する点で好ましい。

【0036】

以下に、細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程について説明する。本発明で、細胞膜および核膜を溶解して核酸を可溶化するには、核酸可溶化試薬を用いる。核酸可溶化試薬としては、カオトロピック塩、界面活性剤および/又はタンパク質分解酵素を含む溶液が挙げられる。

【0037】

細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る方法としては、(I)細胞又はウイルスを含む検体を容器に注入する工程、(II)上記容器に、核酸可溶化試薬溶液を添加し、検体と核酸可溶化試薬溶液を混合する工程、(III)上記で得られた混合液をインキュベートする工程、(IV)インキュベートされた混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程を含む方法を挙げる

ことができる。

【0038】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、検体をホモジナイズ処理することで、自動化処理適正が向上する。ホモジナイズ処理は、例えば、超音波処理、鋭利な突起物を用いる、高速撹拌処理を用いる、微細空隙から押し出す処理、ガラスビーズを用いる処理等で行うことができる。

【0039】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、タンパク質分解酵素を含む核酸可溶化試薬を使用することにより、核酸の回収量及び回収効率が向上し、必要な核酸を含む検体の微量化及び迅速化が可能となる。

【0040】

タンパク質分解酵素は、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼなどから、少なくとも1つのタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。また、タンパク質分解酵素は、複数種以上のタンパク質分解酵素の混合物も好ましく用いることができる。

セリンプロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばプロテアーゼKなどを好ましく用いることができる。システインプロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばパバイン、カテプシン類などを好ましく用いることができる。

金属プロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばカルボキシペプチターゼ等を好ましく用いることができる。

タンパク質分解酵素は、添加時の反応系全容積**1 ml**あたり好ましくは**0.001 IU**~**10 IU**、より好ましくは**0.01 IU**~**1 IU**の濃度で用いることができる。

【0041】

また、タンパク質分解酵素は、核酸分解酵素を含まないタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。また、安定化剤を含んだタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。安定化剤としては、金属イオンを好ましく用いることができる。具体的には、マグネシウムイオンが好ましく、例えば塩化マグネシウムなどの形で添加することができる。タンパク質分解酵素の安定化剤を含ませることにより、核酸の回収に必要なタンパク質分解酵素の微量化が可能となり、核酸の回収に必要なコストを低減することができる。タンパク質分解酵素の安定化剤は、反応系全量に対して好ましくは**1~1000 mM**、より好ましくは**10~100 mM**の濃度で含有することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0042】

タンパク質分解酵素は、予めカオトロピック塩、界面活性剤等のその他の試薬とともに混合されて1つの試薬として核酸の回収に供されても良い。

また、タンパク質分解酵素は、カオトロピック塩、界面活性剤等のその他の試薬とは個別の2つ以上の試薬として供されても良い。後者の場合、タンパク質分解酵素を含む試薬を先に検体と混合した後に、カオトロピック塩、界面活性剤を含む試薬と混合される。また、カオトロピック塩、界面活性剤を含む試薬を先に混合した後に、タンパク質分解酵素を混合してもよい。

また、タンパク質分解酵素を検体または、検体とカオトロピック塩、界面活性剤を含む試薬との混合液に、タンパク質分解酵素保存容器から直接目盛状に滴下させることもできる。この場合、操作を簡便にすることができる。

10

【0043】

核酸可溶性試薬は、乾燥された状態で供給されることも好ましい。また、凍結乾燥のように乾燥された状態のタンパク質分解酵素を予め含む容器を用いることができる。上記の乾燥された状態で供給される核酸可溶性試薬、および乾燥された状態のタンパク質分解酵素を予め含む容器の両方を用いて、核酸を含む試料溶液を得ることもできる。

上記の方法で核酸を含む試料溶液を得る場合、核酸可溶性試薬およびタンパク質分解酵素の保存安定性が良く、核酸収量を変えずに操作を簡便にすることができる。

【0044】

検体と核酸可溶性試薬溶液とを混合する方法は、特に限定されない。

20

混合する際、攪拌装置により30から3000rpmで1秒から3分間混合することが好ましい。これにより、分離精製される核酸収量を増加させることができる。または、転倒混和を5から30回行うことで混合することも好ましい。また、ピettings操作を、10から50回行うことによっても混合することができる、この場合、簡便な操作で分離精製される核酸収量を増加させることができる。

【0045】

検体と核酸可溶性試薬溶液との混合液を、タンパク質分解酵素の至適温度および反応時間でインキュベートすることにより、分離精製される核酸の収量を増加させることができる。インキュベーション温度は、通常20℃～70℃、好ましくはタンパク質分解酵素の至適温度であり、インキュベーション時間は通常1～90分、好ましくはタンパク質分解酵素の至適反応時間である。インキュベーション方法は特に限定されず、浴槽や加温器に入れることで行うことができる。

30

【0046】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、核酸可溶性試薬溶液は、好ましくはpH5～10、より好ましくはpH6～9、さらに好ましくはpH7～8のものを用いられる。

【0047】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、カオトロピック塩の核酸可溶性試薬溶液における濃度は、0.5M以上であることが好ましく、より好ましくは0.5M～4M、さらに好ましくは、1M～3Mである。上記カオトロピック塩としては、塩酸 Guanidinium が好ましいが、他のカオトロピック塩(イソチオシアン酸 Guanidinium、チオシアン酸 Guanidinium)を使用することもできる。更に、カオトロピック塩の代わりに、カオトロピック物質として尿素を用いることもできる。また、これらの塩は単独または複数組み合わせ用いてもよい。

40

【0048】

また、上記の核酸可溶性試薬溶液は水溶性有機溶媒を含んでもよい。この水溶性有機溶媒としてはアルコールが好ましい。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでもよい。アルコールがメチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ブチルアルコール及びその異性体を好ましく用いることができる。これらの水溶性有機溶媒は単独または複数組み合わせ用いてもよい。

50

これら水溶性有機溶媒の核酸可溶化試薬溶液における濃度は1～20質量%であることが好ましい。

【0049】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、検体に混合する界面活性剤は、例えば、ノニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、両性界面活性剤である。

本発明においてはノニオン界面活性剤を好ましく用いることができる。ノニオン界面活性剤は、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤、脂肪酸アルカノールアミドを用いることができるが、好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤を用いることができる、さらに好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤は、POEデシルエーテル、POEラウリルエーテル、POEトリデシルエーテル、POEアルキレンデシルエーテル、POEソルビタンモノラウレート、POEソルビタンモノオレート、POEソルビタンモノステアレート、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、POEアルキルアミン、POEアセチレングリコールから選択されるポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤である。

【0050】

また、カチオン界面活性剤も好ましく用いることができる。さらに好ましくは、カチオン界面活性剤は、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリドから選択されるカチオン界面活性剤である。これらの界面活性剤は、単独または複数組み合わせて用いてもよい。

これら界面活性剤の核酸可溶化試薬溶液における濃度は0.1～20質量%であることが好ましい。

【0051】

DNAなどRNA以外の核酸を回収する場合、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、核酸可溶化試薬溶液にRNA分解酵素を加えることが好ましい。この場合、回収された核酸に共存するRNAによる干渉を軽減することができる。また、DNA分解酵素阻害剤を加えることも好ましい。

一方、RNAなどDNA以外の核酸を回収する場合、核酸可溶化試薬溶液にDNA分解酵素を加えることが好ましい。この場合、回収された核酸に共存するDNAによる干渉を軽減することができる。また、RNA分解酵素阻害剤を加えることも好ましい。RNA分解酵素阻害剤としては、RNA分解酵素を特異的に阻害するものが好ましい。

RNA分解酵素は特に限定されず、例えば、リボヌクレアーゼH(RNase H)等のRNA特異的分解酵素を好ましく用いることができる。

DNA分解酵素は特に限定されず、例えば、DNase I等のDNA特異的分解酵素を好ましく用いることができる。

核酸分解酵素および核酸分解酵素阻害剤は、通常用いられる濃度で用いることができる。また、通常どおり加温処理することができる。加温処理は、タンパク質分解酵素による処理と同時にこなうことが好ましい。

【0052】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、核酸を含む試料溶液には、消泡剤を含有させることも好ましい。上記消泡剤としては、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分が好ましく挙げられ、また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤が好ましい。

【0053】

消泡剤の具体例としては、シリコン系消泡剤(例えば、シリコンオイル、ジメチルポリシロキサン、シリコンエマルジョン、変性ポリシロキサン、シリコンコンパウンド

10

20

30

40

50

など)、アルコール系消泡剤(例えば、アセチレングリコール、ヘプタノール、エチルヘキサノール、高級アルコール、ポリオキシアルキレングリコールなど)、エーテル系消泡剤(例えば、ヘプタセロソルブ、ノニルセロソルブ-3-ヘプタシルビトールなど)、油脂系消泡剤(例えば、動植物油など)、脂肪酸系消泡剤(例えば、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸など)、金属セッケン系消泡剤(例えば、ステアリン酸アルミ、ステアリン酸カルシウムなど)、脂肪酸エステル系消泡剤(例えば、天然ワックス、トリブチルホスフェートなど)、燐酸エステル系消泡剤(例えば、オクチルリン酸ナトリウムなど)、アミン系消泡剤(例えば、ジアミルアミンなど)、アミド系消泡剤(例えば、ステアリン酸アミドなど)、その他の消泡剤(例えば、硫酸第二鉄、ボーキサイトなど)などが挙げられる。特に好ましくは、消泡剤として、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分を組み合わせて使用することができる。また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤を使用することも好ましい。

10

【0054】

また、上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、得られた核酸を含む試料溶液は、表面張力は 0.050 J/m^2 以下であることが好ましく、また、粘度は、 $1\sim10000\text{ mPa}$ であることが好ましく、比重は、 $0.8\sim1.2$ であることが好ましい。

【0055】

上記の細胞膜および核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、インキュベートされた混合液に添加する水溶性有機溶媒は、アルコールを好ましく用いることができる。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでもよく、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、ブチルアルコール及びその異性体を好ましく用いることができる。これら水溶性有機溶媒の核酸を含む試料溶液における最終濃度は、 $5\sim90$ 質量%であることが好ましい。

20

【0056】

以下に、本発明で用いる核酸吸着性多孔性膜および吸着工程について説明する。本発明の核酸吸着性多孔性膜は、溶液が内部を通過可能なものである。ここで「溶液が内部を通過可能」とは、膜の一方の面が接する空間と膜の他方の面が接する空間の間に圧力差を生じさせた場合に、高圧の空間側から低圧の空間側へと、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。または、膜に遠心力を掛けた場合に、遠心力の方向に、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。

30

【0057】

本発明の核酸吸着性多孔性膜は、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であることが好ましい。これは、多孔性膜側の使用条件で「イオン化」していないことを意味し、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔性膜が引き合うようになると推定される。これにより分離性能に優れ、しかも洗浄効率よく、核酸を単離精製することができる。好ましくは、核酸吸着性多孔性膜は、親水基を有する多孔性膜であり、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔性膜の親水基同士が引きあうようになることと推定される。ここで、親水基を有する多孔性膜とは、多孔性膜を形成する材料自体が、親水性基を有する多孔性膜、または多孔性膜を形成する材料を処理またはコーティングすることによって親水基を導入した多孔性膜を意味する。多孔性膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでも良い。例えば、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜などを、使用することができるが、加工の容易性から、多孔性膜を形成する材料は有機高分子などの有機材料を用いることが好ましい。

50

【0058】

親水基とは、水との相互作用を持つことができる有極性の基（原子団）を指し、核酸の吸着に関与する全ての基（原子団）が当てはまる。親水基としては、水との相互作用の強さが中程度のもの（化学大事典、共立出版株式会社発行、「親水基」の項の「あまり親水性の強くない基」参照）が良く、例えば、水酸基、カルボキシル基、シアノ基、オキシエチレン基などを挙げるができる。好ましくは水酸基である。

【0059】

水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などで、形成された多孔性膜を挙げるができるが、特に多糖構造を有する有機材料の多孔性膜を好ましく使用することができる。

10

【0060】

多糖構造を有する有機材料としては、セルロース、ヘミセルロース、デキストラン、アガロース、デキストリン、アミロース、アミロペクチン、デンプン、グリコゲン、プルラン、マンナン、グルコマンナン、リケナン、イソリケナン、ラミナラン、カラギーナン、キシラン、フルクタン、アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン、キチン、キトサン等を好ましく用いることができるが、多糖構造およびその誘導体であれば前記に挙げた材料に限定されることはない。また、前記いずれかの多糖構造のエステル誘導体についても好ましく用いることができる。また、前記いずれかの多糖構造のエステル誘導体の酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

20

【0061】

前記いずれかの多糖構造のエステル誘導体のエステルとしては、カルボン酸エステル、硝酸エステル、硫酸エステル、スルホン酸エステル、リン酸エステル、ホスホン酸エステル、ピロリン酸エステルのいずれか一つ以上から選ばれることが好ましい。また、前記いずれかの多糖構造のカルボン酸エステル、硝酸エステル、硫酸エステル、スルホン酸エステル、リン酸エステル、ホスホン酸エステル、ピロリン酸エステルの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

【0062】

前記いずれかの多糖構造のカルボン酸エステルとしては、アルキルカルボニルエステル、アルケニルカルボニルエステル、芳香族カルボニルエステル、芳香族アルキルカルボニルエステルのいずれか一つ以上から選ばれることが好ましい。また、前記いずれかの多糖構造のアルキルカルボニルエステル、アルケニルカルボニルエステル、芳香族カルボニルエステル、芳香族アルキルカルボニルエステルの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

30

【0063】

前記いずれかの多糖構造のアルキルカルボニルエステルのエステル基としては、アセチル基、プロピオニル基、ブチロイル基、パレル基、ペプタノイル基、オクタノイル基、デカノイル基、ドデカノイル基、トリデカノイル基、ヘキサデカノイル基、オクタデカノイル基のいずれか一つ以上から選ばれることが好ましい。また、前記アセチル基、プロピオニル基、ブチロイル基、パレル基、ペプタノイル基、オクタノイル基、デカノイル基、ドデカノイル基、トリデカノイル基、ヘキサデカノイル基、オクタデカノイル基のいずれか一つ以上から選ばれるエステル基を持つ前記いずれかの多糖構造の酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

40

【0064】

前記いずれかの多糖構造のアルケニルカルボニルエステルのエステル基がアクリル基、メタクリル基のいずれか一つ以上から選ばれることが好ましい。また、前記アクリル基、メタクリル基のいずれか一つ以上から選ばれるエステル基を持つ前記いずれかの多糖構造の酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

【0065】

50

前記いずれかの多糖構造の芳香族カルボニルエステルのエステル基がベンゾイル基、ナフタロイル基の少なくとも一つ以上から選ばれることが好ましい。また、前記ベンゾイル基、ナフタロイル基の少なくとも一つ以上から選ばれるエステル基を持つ前記いずれかの多糖構造の酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

【0066】

前記いずれかの多糖構造の硝酸エステルとしては、ニトロセルロース、ニトロヘミセルロース、ニトロデキストラン、ニトロアガロース、ニトロデキストリン、ニトロアミロース、ニトロアミロペクチン、ニトログリコーゲン、ニトロプルラン、ニトロマンナン、ニトログルコマンナン、ニトロリケナン、ニトロイソリケナン、ニトロラミナラン、ニトロカラギーナン、ニトロキシラン、ニトロフルクタン、ニトロアルギン酸、ニトロヒアルロン酸、ニトロコンドロイチン、ニトロキチン、ニトロキトサンなどを好ましく用いることができる。

10

また、前記、ニトロセルロース、ニトロヘミセルロース、ニトロデキストラン、ニトロアガロース、ニトロデキストリン、ニトロアミロース、ニトロアミロペクチン、ニトログリコーゲン、ニトロプルラン、ニトロマンナン、ニトログルコマンナン、ニトロリケナン、ニトロイソリケナン、ニトロラミナラン、ニトロカラギーナン、ニトロキシラン、ニトロフルクタン、ニトロアルギン酸、ニトロヒアルロン酸、ニトロコンドロイチン、ニトロキチン、ニトロキトサンなどの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

【0067】

前記いずれかの多糖構造の硫酸エステルとしては、セルロース硫酸、ヘミセルロース硫酸、デキストラン硫酸、アガロース硫酸、デキストリン硫酸、アミロース硫酸、アミロペクチン硫酸、グリコーゲン硫酸、プルラン硫酸、マンナン硫酸、グルコマンナン硫酸、リケナン硫酸、イソリケナン硫酸、ラミナラン硫酸、カラギーナン硫酸、キシラン硫酸、フルクタン硫酸、アルギン酸硫酸、ヒアルロン酸硫酸、コンドロイチン硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸などを好ましく用いることができる。また、前記、セルロース硫酸、ヘミセルロース硫酸、デキストラン硫酸、アガロース硫酸、デキストリン硫酸、アミロース硫酸、アミロペクチン硫酸、グリコーゲン硫酸、プルラン硫酸、マンナン硫酸、グルコマンナン硫酸、リケナン硫酸、イソリケナン硫酸、ラミナラン硫酸、カラギーナン硫酸、キシラン硫酸、フルクタン硫酸、アルギン酸硫酸、ヒアルロン酸硫酸、コンドロイチン硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸などの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

20

30

【0068】

前記いずれかの多糖構造のスルホン酸エステルとしては、アルキルスルホン酸エステル、アルケニルスルホン酸エステル、芳香族スルホン酸エステル、芳香族アルキルスルホン酸エステルのいずれか一つ以上から選ばれることが好ましい。また、前記いずれかの多糖構造のアルキルスルホン酸エステル、アルケニルスルホン酸エステル、芳香族スルホン酸エステル、芳香族アルキルスルホン酸エステルの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

【0069】

前記いずれかの多糖構造のリン酸エステルとしては、セルロースリン酸、ヘミセルロースリン酸、デキストランリン酸、アガロースリン酸、デキストリンリン酸、アミロースリン酸、アミロペクチンリン酸、グリコーゲンリン酸、プルランリン酸、マンナンリン酸、グルコマンナンリン酸、リケナンリン酸、イソリケナンリン酸、ラミナランリン酸、カラギーナンリン酸、キシランリン酸、フルクタンリン酸、アルギン酸リン酸、ヒアルロン酸リン酸、コンドロイチンリン酸、キチンリン酸、キトサンリン酸などを好ましく用いることができる。また、前記、セルロースリン酸、ヘミセルロースリン酸、デキストランリン酸、アガロースリン酸、デキストリンリン酸、アミロースリン酸、アミロペクチンリン酸、グリコーゲンリン酸、プルランリン酸、マンナンリン酸、グルコマンナンリン酸、リケナンリン酸、イソリケナンリン酸、ラミナランリン酸、カラギーナンリン酸、キシランリン酸、フルクタンリン酸、アルギン酸リン酸、ヒアルロン酸リン酸、コンドロイチンリン酸、キチンリン酸、キトサンリン酸などの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

40

50

できる。

【0070】

前記いずれかの多糖構造のホスホン酸エステルとしては、セルロースホスホン酸、ヘミセルロースホスホン酸、デキストランホスホン酸、アガロースホスホン酸、デキストリンホスホン酸、アミロースホスホン酸、アミロペクチンホスホン酸、グリコーゲンホスホン酸、プルランホスホン酸、マンナンホスホン酸、グルコマンナンホスホン酸、リケナンホスホン酸、イソリケナンホスホン酸、ラミナランホスホン酸、カラギーナンホスホン酸、キシランホスホン酸、フルクタンホスホン酸、アルギン酸ホスホン酸、ヒアルロン酸ホスホン酸、コンドロイチンホスホン酸、キチンホスホン酸、キトサンホスホン酸などを好ましく用いることができる。また、前記、セルロースホスホン酸、ヘミセルロースホスホン酸、デキストランホスホン酸、アガロースホスホン酸、デキストリンホスホン酸、アミロースホスホン酸、アミロペクチンホスホン酸、グリコーゲンホスホン酸、プルランホスホン酸、マンナンホスホン酸、グルコマンナンホスホン酸、リケナンホスホン酸、イソリケナンホスホン酸、ラミナランホスホン酸、カラギーナンホスホン酸、キシランホスホン酸、フルクタンホスホン酸、アルギン酸ホスホン酸、ヒアルロン酸ホスホン酸、コンドロイチンホスホン酸、キチンホスホン酸、キトサンホスホン酸などの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

10

【0071】

前記いずれかの多糖構造のピロリン酸エステルとしては、セルロースピロリン酸、ヘミセルロースピロリン酸、デキストランピロリン酸、アガロースピロリン酸、デキストリンピロリン酸、アミロースピロリン酸、アミロペクチンピロリン酸、グリコーゲンピロリン酸、プルランピロリン酸、マンナンピロリン酸、グルコマンナンピロリン酸、リケナンピロリン酸、イソリケナンピロリン酸、ラミナランピロリン酸、カラギーナンピロリン酸、キシランピロリン酸、フルクタンピロリン酸、アルギン酸ピロリン酸、ヒアルロン酸ピロリン酸、コンドロイチンピロリン酸、キチンピロリン酸、キトサンピロリン酸などを好ましく用いることができる。また、前記、セルロースピロリン酸、ヘミセルロースピロリン酸、デキストランピロリン酸、アガロースピロリン酸、デキストリンピロリン酸、アミロースピロリン酸、アミロペクチンピロリン酸、グリコーゲンピロリン酸、プルランピロリン酸、マンナンピロリン酸、グルコマンナンピロリン酸、リケナンピロリン酸、イソリケナンピロリン酸、ラミナランピロリン酸、カラギーナンピロリン酸、キシランピロリン酸、フルクタンピロリン酸、アルギン酸ピロリン酸、ヒアルロン酸ピロリン酸、コンドロイチンピロリン酸、キチンピロリン酸、キトサンピロリン酸などの酸化物についてもさらに好ましく用いることができる。

20

30

【0072】

前記いずれかの多糖構造のエーテル誘導体としては、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、カルボキシエチルカルバモイルエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、シアノエチルセルロース、カルバモイルエチルセルロース等を用いることができるが、これらに限定されることはない。好ましくは、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースを用いることができる。

40

【0073】

前記いずれかの多糖構造の水酸基が、任意の置換度でハロゲン化したものについても好ましく用いることができる。

【0074】

多糖構造を有する有機高分子から成る多孔性膜として好ましくは、アセチルセルロースが挙げられ、更にアセチル値の異なるアセチルセルロース混合物から成る有機高分子の多孔性膜を使用することができる。アセチル値の異なるアセチルセルロース混合物として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセ

50

チルセルロース混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物を好ましく使用することができる。特にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物を好ましく使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比(質量比)は、99:1~1:99である事が好ましく、90:10~50:50である事がより好ましい。

【0075】

特に好ましい、アセチルセルロースから成る多孔性膜としては、特開2003-128691号公報に記載の、アセチルセルロースの表面酸化物からなる多孔性膜が挙げられる。アセチルセルロースの表面酸化物とは、アセチルセルロースまたはアセチル値の異なるアセチルセルロース混合物を酸化处理したものであり、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の酸化物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の酸化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の酸化物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の酸化物も好ましく使用することができる。より好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の酸化物を使用することである。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比(質量比)は、99:1~1:99であることが好ましい。更に好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比は、90:10~50:50であることである。この場合、酸化处理の程度(酸化率)で固相表面の水酸基の量(密度)をコントロールすることができる。核酸の分離効率をあげるためには、水酸基の量(密度)が多い方が好ましい。酸化处理により得られる多孔性膜の酸化率(表面酸化率)が5%以上100%以下であることが好ましく、10%以上100%以下であることが更に好ましい。

【0076】

ここで多孔性膜は、酸化处理の前に比べて酸化处理の後で、平均孔径が減少している多孔性膜であることが好ましい。酸化处理の前に対する酸化处理の後の平均孔径の比が0.8以下の多孔性膜であることが好ましく、0.5以下の多孔性膜であることが更に好ましい。

【0077】

ここで、酸化处理とは、アセチルセルロースを酸化处理液(例えば水酸化ナトリウム水溶液)に接触させることを言う。これにより、酸化处理液に接触したアセチルセルロースの部分は、再生セルロースとなり水酸基が導入される。こうして作成された再生セルロースは、本来のセルロースとは、結晶状態等の点で異なっている。本発明において多孔性膜として、再生セルロースの多孔性膜を用いることが好ましい。

また、酸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度を変えて酸化处理を行えば良い。酸化率は、NMR、IR又はXPSにより、容易に測定することができる(例えば、カルボニル基のピーク減少の程度で定めることができる)。

【0078】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法として、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有するグラフトポリマー鎖を多孔性膜に結合させることができる。

有機材料の多孔性膜にグラフトポリマー鎖を結合する方法としては、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、多孔性膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させグラフトポリマー鎖とする2つの方法がある。

【0079】

まず、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる方法においては、ポリマーの末端または側鎖に多孔性膜と反応する官能基を有するポリマーを使用し、この官能基と、多孔性膜の官能基とを化学反応させることでグラフトさせることができる。多孔性膜と反応する官能基としては、多孔性膜の官能基と反応し得るものであれば特に限定はないが、例えば、アルコキシシランのようなシランカップリング基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシ基、スルホン酸基、リン酸基、エポキシ基、アリール基、メタクリロイル基、アクリロイル基等を挙げるることができる。

10

20

30

40

50

【0080】

ポリマーの末端、または側鎖に反応性官能基を有するポリマーとして特に有用な化合物は、トリアルコキシシリル基をポリマー末端に有するポリマー、アミノ基をポリマー末端に有するポリマー、カルボキシ基をポリマー末端に有するポリマー、エポキシ基をポリマー末端に有するポリマー、イソシアネート基をポリマー末端に有するポリマーが挙げられる。この時に使用されるポリマーとしては、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、具体的には、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレンなどを挙げることができる。

10

【0081】

多孔性膜を基点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させ、グラフトポリマー鎖を形成させる方法は、一般的には表面グラフト重合と呼ばれる。表面グラフト重合とは、プラズマ照射、光照射、加熱などの方法で基材表面上に活性種を与え、多孔性膜と接するように配置された重合可能な二重結合を有する化合物を重合によって多孔性膜と結合させる方法を指す。

基材に結合しているグラフトポリマー鎖を形成するのに有用な化合物は、重合可能な二重結合を有しており、核酸の吸着に関与する親水基を有するという、2つの特性を兼ね備えていることが必要である。これらの化合物としては、分子内に二重結合を有していれば、親水基を有するポリマー、オリゴマー、モノマーのいずれの化合物をも用いることができる。特に有用な化合物は親水基を有するモノマーである。

20

【0082】

特に有用な親水基を有するモノマーの具体例としては、次のモノマーを挙げることができる。例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸性基含有モノマーを特に好ましく用いることができる。また、アクリル酸、メタアクリル酸等のカルボキシ基含有モノマー、もしくはそのアルカリ金属塩及びアミン塩も好ましく用いることができる。

【0083】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができるが、多糖構造を有するポリマーが好ましい。

30

【0084】

また、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理することもできる。この場合、酸化率が約5%以上であることが好ましい。さらには、酸化率が約10%以上であることが好ましい。

40

【0085】

親水基を有する無機材料である多孔性膜としては、シリカ化合物を含有する多孔性膜を挙げることができる。シリカ化合物を含有する多孔性膜としては、ガラスフィルターを挙げることができる。また、特許公報第3058342号に記載されているような、多孔質のシリカ薄膜を挙げることができる。この多孔質のシリカ薄膜とは、二分子膜形成能を有するカチオン型の両親媒性物質の展開液を基板上に展開した後、基板上の液膜から溶媒を除去することによって両親媒性物質の多層二分子膜薄膜を調整し、シリカ化合物を含有する溶液に多層二分子膜薄膜を接触させ、次いで前記多層二分子膜薄膜を抽出除去すること

50

で作製することができ。

【0086】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法としては、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する2つの方法がある。

多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる場合は、グラフトポリマー鎖の末端の官能基と反応する官能基を無機材料に導入し、そこにグラフトポリマーを化学結合させる。また、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する場合は、二重結合を有する化合物を重合する際の起点となる官能基を無機材料に導入する。親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーとしては、上記、親水基を持たない有機材料の多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法において、記載した親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを好ましく使用することができ。

【0087】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができ。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げる事ができる。

【0088】

また、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理することもできる。この場合、酸化率が約5%以上であることが好ましい。さらには、酸化率が約10%以上であることが好ましい。

【0089】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜としては、アルミニウム等の金属、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックス、もしくはニューセラミックス、シリコン、活性炭等を加えて作製した多孔性膜を挙げることができ。

【0090】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、厚さが $10\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$ である多孔性膜を用いる事ができる。さらに好ましくは、厚さが $50\mu\text{m} \sim 250\mu\text{m}$ である多孔性膜を用いる事ができる。洗浄がしやすい点で、厚さが薄いほど好ましい。

【0091】

また、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、平均孔径が $0.9 \sim 5.0\mu\text{m}$ の多孔性膜を用いることが好ましい。更に好ましくは、平均孔径が $1.5 \sim 3.5\mu\text{m}$ の多孔性膜を用いる。これにより、核酸が吸着するのに十分な表面積が得られるとともに、目詰まりし難くなり、好ましい。この溶液が内部を通過可能な多孔性膜の平均孔径は、パブルポイント法(ASTM F316-86、JIS K3832準拠)を用いて決定することができ。

【0092】

前期の溶液が内部を通過可能な固相は、表裏対称性の多孔性膜であってもよいが、表裏非対称性の多孔性膜であることが好ましい。ここで、表裏非対称性とは、多孔性膜の一方の面から他方の面へと膜の物理的性質または化学的性質が変化している性質を示す。膜の物理的性質の例としては、平均孔径が挙げられる。また膜の化学的性質としては酸化度が挙げられる。平均孔径が表裏非対称性の多孔性膜を本発明で使用する場合は、液の通過す

10

20

30

40

50

る方向に平均孔径が、大→小に変化するようにするのが好ましい。ここで、最大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔性膜を用いる事が好ましい。さらに好ましくは、最大孔径と最小孔径の比が5以上である。これにより、核酸が吸着するのに十分な表面積が得られるとともに、目詰まりし難い。

【0093】

また、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、空隙率が50～95%である多孔性膜を用いる事ができる。さらに好ましくは、空隙率が65～80%である多孔性膜を用いる事ができる。また、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、パルポイントが、 $0.1 \sim 10 \text{ kg f / cm}^2$ である多孔性膜を用いる事ができる。さらに好ましくは、パルポイントが、 $0.2 \sim 4 \text{ kg f / cm}^2$ である多孔性膜を用いる事ができる。

10

【0094】

また、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、圧力損失が、 $0.1 \sim 100 \text{ kPa}$ である多孔性膜を用いる事が好ましい。これにより、過圧時に均一な圧力が得られ、好ましい。さらに好ましくは、圧力損失が、 $0.5 \sim 50 \text{ kPa}$ である多孔性膜を用いる事ができる。ここで、圧力損失とは、膜の厚さ $100 \mu\text{m}$ あたり、水を通過させるのに必要な最低圧力である。

【0095】

また、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、また、 25°C で 1 kg / cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜 1 cm^2 あたり1分間で $1 \sim 5000 \text{ mL}$ である多孔性膜を用いることができる。さらに好ましくは、 25°C で 1 kg / cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜 1 cm^2 あたり1分間で $5 \sim 1000 \text{ mL}$ である多孔性膜を用いることができる。

20

【0096】

また、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、多孔性膜 1 m あたりの核酸の吸着量が $0.1 \mu\text{g}$ 以上である多孔性膜を好ましく使用する事ができる。さらに好ましくは、多孔性膜 1 m あたりの核酸の吸着量が $0.9 \mu\text{g}$ 以上である多孔性膜を用いることができる。

【0097】

また、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜としては、一辺が 5 mm の正方形の多孔性膜をトリフルオロ酢酸 5 mL に浸漬したときに、1時間以内では溶解しないが48時間以内に溶解するセルロース誘導体からなる多孔性膜を好ましく使用する事ができる。また、一辺が 5 mm の正方形の多孔質膜をトリフルオロ酢酸 5 mL に浸漬したときに1時間以内に溶解するが、ジクロロメタン 5 mL に浸漬したときには24時間以内に溶解しないセルロース誘導体からなる多孔性膜を好ましく使用する事ができる。

30

【0098】

核酸吸着性多孔性膜中を、核酸を含む試料溶液を通過させる場合、試料溶液を一方の面から他方の面へと通過させることが、液を多孔性膜へ均一に接触させることができる点で、好ましい。核酸吸着性多孔性膜中を、核酸を含む試料溶液を通過させる場合、試料溶液を核酸吸着性多孔性膜の孔径が大きい側から小さい側に通過させることが、目詰まりし難い点で、好ましい。

40

【0099】

核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜を通過させる場合の流速は、液の多孔性膜への適切な接触時間を得るために、膜の面積 cm^2 あたり、 $2 \sim 1500 \mu\text{L / sec}$ である事が好ましい。液の多孔性膜への接触時間が短すぎると十分な分離精製効果が得られず、長すぎると操作性の点から好ましくない。さらに、上記流速は、膜の面積 cm^2 あたり、 $5 \sim 700 \mu\text{L / sec}$ である事が好ましい。

【0100】

また、使用する溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、1枚であってもよいが、複数枚を使用することもできる。複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであつて

50

も、異なるものであって良い。

【0101】

少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。また、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。この場合、少なくとも二個の開口を有する容器内に収容される複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであって良い。

【0102】

複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、無機材料の核酸吸着性多孔性膜と有機材料の核酸吸着性多孔性膜との組合せであっても良い。例えば、ガラスフィルターと再生セルロースの多孔性膜との組合せを挙げることができる。また、複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、無機材料の核酸吸着性多孔性膜と有機材料の核酸非吸着性多孔性膜との組合せであってもよい。例えば、ガラスフィルターと、ナイロンまたはポリスルホンの多孔性膜との組合せを挙げることができる。

【0103】

核酸分離精製カートリッジは、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容する以外、その他の部材を収容していないことが好ましい。上記の容器の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニルなどのプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好ましく使用することができる。また、上記の容器は透明であっても、着色してあっても良い。

【0104】

核酸分離精製カートリッジとして、個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段を備えている核酸分離精製カートリッジを使用する事ができる。個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段としては、バーコード、磁気テープなどが挙げられる。

【0105】

また、少なくとも二個の開口を有する容器内から核酸吸着性多孔性膜を容易に取り出す事が可能になっている構造を有した核酸分離精製カートリッジを使用することもできる。

【0106】

上記に記載した、各々の溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容する核酸分離精製カートリッジを用いて、以下の工程で核酸を分離精製することができる。

すなわち、(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加压状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加压状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加压状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程が挙げることができる。

【0107】

また、別の態様としては、(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カート

10

20

30

40

50

リッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの上記他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジの上記他の開口に結合された圧差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、上記他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジの上記他の開口に結合された圧差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、又は核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、上記他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程をおこなうことができる。

【0108】

また、別の核酸分離精製工程としては、(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程を行うこともできる。

【0109】

以下、洗浄工程について説明する。洗浄を行うことにより、核酸の回収量及び純度が向上し、必要な核酸を含む検体の量を微量とすることができる。また、洗浄や回収操作を自動化することによって、操作が簡便かつ迅速に行うことが可能になる。洗浄工程は、迅速化のためには1回の洗浄で済ませてもよく、また純度がより重要な場合には複数回洗浄を繰返すことが好ましい。

【0110】

洗浄工程において、洗浄液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジへ供給される。供給された洗浄液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口(核酸を含む試料溶液を注入した開口)から供給され、該開口に結合された圧差発生装置(例えばスポンジ、注射器、ポンプ、パワーピペットなど)を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加压状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、洗浄液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より洗浄液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が洗浄効率が悪くてより好ましい。

洗浄工程における洗浄液の流量は、 $2\mu\text{l}/\text{mm}^2$ 以上が好ましい。洗浄流量が多量であれば洗浄効果は向上するが、操作性を保ち、試料の流出を抑止するためには、 $200\mu\text{l}/\text{mm}^2$ 以下が好ましい。

【0111】

10

20

30

40

50

洗浄工程において、洗浄液を核酸吸着性多孔性膜を通過させる場合の流速は、膜の単位面積 (cm^2) あたり、 $2-1500 \mu\text{L}/\text{sec}$ であることが好ましく、 $5-700 \mu\text{L}/\text{sec}$ であることがより好ましい。通過速度を下げて時間を掛ければ洗浄がそれだけ十分に行なわれることになるが、核酸の分離精製操作の迅速化も重要であるので上記した範囲が選択される。

【0112】

洗浄工程において、洗浄液の液温は $4-70^\circ\text{C}$ であることが好ましい。さらには、洗浄液の液温を室温とすることがより好ましい。

また洗浄工程において、その核酸分離精製カートリッジを器械的な振動や超音波による攪拌を与えながら、または遠心分離により洗浄することもできる。

【0113】

洗浄工程において、洗浄液には、一般的には核酸分解酵素のような酵素を含ませないが、タンパク質等の夾雑物質を分解する酵素を含ませることができ、また、場合によってはDNA分解酵素、RNA分解酵素などを含ませることもできる。DNA分解酵素を含む洗浄液を使用することにより、検体中のRNAのみを選択的に回収することができる。逆に、RNA分解酵素を含む洗浄液を使用することにより、検体中のDNAのみを選択的に回収することができる。

【0114】

洗浄工程において、洗浄液は、水溶性有機溶媒及び/または水溶性塩を含んでいる溶液であることが好ましい。洗浄液は、核酸吸着性多孔性膜に核酸と共に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する必要がある。そのためには、核酸吸着性多孔性膜から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成であることが必要である。この目的には、アルコール等の水溶性有機溶媒が核酸が難溶性であるので、核酸を保持したまま核酸以外の成分を脱着させるのに適している。また、水溶性塩を添加することにより、核酸の吸着効果が高まるので、不要成分の選択的除去作用が向上する。

【0115】

洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-イソプロパノール、ブタノール、アセトンなどを用いることができ、中でもエタノールを用いることが好ましい。洗浄液中に含まれる水溶性有機溶媒の量は、 $20-100$ 質量%であることが好ましく、 $40-80$ 質量%であることがより好ましい。

【0116】

一方、洗浄液に含まれる水溶性塩は、ハロゲン化物の塩であることが好ましく、中でも塩化物が好ましい。また、水溶性塩は、一価または二価のカチオンであることが好ましく、特にアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩が好ましく、中でもナトリウム塩及びカリウム塩が好ましくナトリウム塩が最も好ましい。

水溶性塩が洗浄液に含まれる場合、その濃度は $10 \text{ mM}/\text{L}$ 以上であることが好ましく、その上限は不純物の溶解性を損なわない範囲でそれほど問わないが、 $1 \text{ M}/\text{L}$ 以下であることが好ましく、 $0.1 \text{ M}/\text{L}$ 以下であることがより好ましい。

とりわけ、水溶性塩が塩化ナトリウムであり、さらには、塩化ナトリウムが $20 \text{ mM}/\text{L}$ 以上含まれていることが特に好ましい。

【0117】

洗浄液は、カオトロピック物質を含んでいないことが好ましい。それによって、洗浄工程に引き続く回収工程にカオトロピック物質が混入する可能性を減らすことができる。回収工程時に、カオトロピック物質が混入すると、しばしばPCR反応等の酵素反応を阻害するので、後の酵素反応等を考慮すると洗浄液にカオトロピック物質を含まないことが理想的である。また、カオトロピック物質は、腐食性で有害であるので、この点でもカオトロピック物質を用いないで済むことは、実験者にとっても試験操作の安全上極めて有利である。

ここで、カオトロピック物質とは、前記したように尿素、グアニジン塩、イソチアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウムなどである。

10

20

30

40

50

【0118】

従来、核酸分離精製工程における洗浄工程の際、洗浄液がカートリッジなどの容器に対する濡れ性が高いため、しばしば洗浄液が容器中に残留することになり、洗浄工程に続く回収工程への洗浄液の混入して核酸の純度の低下や次工程における反応性の低下などの原因となっている。したがって、カートリッジなどの容器を用いて核酸の吸着及び脱着を行う場合、吸着、洗浄時に用いる液、特に洗浄液が、次の工程に影響を及ぼさないように、カートリッジ内に洗浄残液が残留しないことは重要である。

【0119】

したがって、洗浄工程における洗浄液が次工程の回収液に混入することを防止して、洗浄液のカートリッジ内への残留を最小限に留めるため、洗浄液の表面張力を 0.035 J/m^2 未満にすることが好ましい。表面張力を低くすれば洗浄液とカートリッジの濡れ性が向上し、残留する液量を抑えることができる。

10

【0120】

逆に、洗浄工程における洗浄液のカートリッジへの残留を減少させる目的で、洗浄液の表面張力を 0.035 J/m^2 以上にして、カートリッジとの撥水性を高めて液滴を形成させ、その液滴が流れ落ちることによって残留する液量を抑えることもできる。核酸を吸着した多孔性膜、回収液、洗浄液の組合せなどによっていずれかの表面張力が選択される。

【0121】

本発明に係る核酸吸着性多孔性膜を利用して洗浄工程を簡素化することができる。(1) 洗浄液が核酸吸着性多孔性膜を通過する回数を1回でよい、(2) 洗浄工程を室温でできる。(3) 洗浄後、直ちに回収液をカートリッジに注入することができる。(4) 前記(1)、(2)及び(3)のいずれかが1つ又は2つ以上のも可能である。従来法においては、洗浄液中に含まれる有機溶媒を迅速に取り除くため、しばしば乾燥工程を必要としたが、本発明に係る核酸吸着性多孔性膜は薄膜であるためにこれを省略できるからである。

20

【0122】

従来、核酸分離精製工程において、洗浄工程の際、しばしば洗浄液が飛散し他に付着することによって、試料のコンタミネーション（汚染）が起きることが問題となっている。洗浄工程におけるこの種のコンタミネーションは、二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと廃液容器の形状とを工夫することによって抑止することができる。

30

【0123】

以下に核酸吸着性多孔性膜から核酸を脱着させて回収する工程について示す。

回収工程において、回収液は、チューブ、ビベット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を装着した核酸分離精製カートリッジへ供給される。回収液は、核酸分離精製カートリッジの開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスライド、注射器、ポンプ、パワービベットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、回収液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より回収液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させる方法が回収効率が悪くより好ましい。

40

【0124】

検体から調整した核酸を含む試料溶液の体積に対して、回収液の体積を調整して核酸の脱着を行うことができる。分離精製された核酸を含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100 μl であるが、検体量が極微量である時や、逆に大量の核酸を分離精製したい場合には回収液量は $1 \mu\text{l}$ から数100 ml の範囲で変える事ができる。

50

【0125】

回収液としては好ましくは精製蒸留水、Tris / EDTA バッファー等のバッファー水溶液を使用できる。また、回収した核酸をPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) に供する場合、PCR 反応において用いる緩衝溶液 (例えば、KCl 50 mmol / l、Tris - Cl 10 mmol / l、MgCl₂ 1.5 mmol / l を最終濃度とする水溶液) を用いることもできる。

【0126】

回収液のpHは、pH2～11であることが好ましい。さらには、pH5～9であることが好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着核酸の溶出に効果を及ぼす。回収液は、290 mmol / l 以下のイオン強度であることが好ましく、さらには、90 mmol / l 以下の塩濃度であることが好ましい。こうすることで、核酸の回収率が向上し、より多くの核酸を回収できることができる。回収される核酸はDNAでもRNAでも、1本鎖でも2本鎖でも、および直鎖状でも環状でも良い。

【0127】

回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液の体積と比較して少なくすることによって、濃縮された核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積) : (試料溶液体積) = 1 : 100～99 : 100、更に好ましくは、(回収液体積) : (試料溶液体積) = 1 : 10～9 : 10にすることができる。これにより核酸分離精製後工程において濃縮のための操作をすることなく、簡単に核酸を濃縮できる。これらの方法により検体よりも核酸が濃縮されている核酸溶液を得る方法を提供できる。

【0128】

また別の方法としては、回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液よりも多い条件で核酸の脱着を行うことにより、希望の濃度の核酸を含む回収液を得ることができる。PCRなどに適した濃度の核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積) : (試料溶液体積) = 1 : 1～50 : 1、更に好ましくは、(回収液体積) : (試料溶液体積) = 1 : 1～5 : 1にすることができる。これにより核酸分離精製後に濃度調整をする煩雑さがなくなるといったメリットを得られる。更に、十分な回収液を使用することにより、多孔性膜からの核酸回収率の増加を図ることができる。

【0129】

また、目的に応じて回収液の温度を変化させることで簡単に核酸を回収することができる。例えば、回収液の温度を0～10℃にして多孔性膜からの核酸の脱着を行うことで、酵素による分解を防止する何らかの試薬や特別な操作を加えることなく核酸分解酵素の働きを抑制して、核酸の分解を防ぎ、簡単に、効率よく核酸溶液を得ることができる。

【0130】

また、回収液の温度を10～35℃とした場合、一般的な室温で核酸の回収を実施することが出来、複雑な工程を必要とせずに核酸を脱着させて分離精製することができる。

【0131】

また別の方法としては、回収液の温度を高温、例えば35～70℃すること、多孔性膜からの核酸の脱着を煩雑な操作を経ず簡単に高い回収率で実施することができる。

【0132】

回収液の注入回数は限定されるものではなく、1回でも複数回でもよい。通常、迅速、簡単に核酸を分離精製する場合は、1回の回収で実施するが、大量の核酸を回収する場合等複数回にわたり回収液を注入する事がある。

【0133】

回収工程においては、核酸の回収液をその後の後工程に使用できる組成にしておくことが可能である。分離精製された核酸は、しばしばPCR (ポリメラーゼチェーンリアクション) 法により増幅される。この場合、分離精製された核酸溶液はPCR法に適したバッファー液で希釈する必要がある。本方法による回収工程において、回収液にPCR法に適したバッファー液を用いることで、その後のPCR工程へ簡便、迅速に移行することができる。

10

20

30

40

50

【0134】

また、回収工程において、核酸の回収液に回収した核酸の分解を防ぐための安定化剤を添加しておくことも可能である。安定化剤としては、抗菌剤、抗力ヒ^{*}剤や核酸分解抑制剤などを添加することができる。核酸分解酵素の阻害剤としてはEDTAなどが上げられる。また別の実施態様として、回収容器にあらかじめ安定化剤を添加しておくこともできる。

【0135】

また、回収工程で用いられる回収容器には特に限定はないが、260nmの吸収が無い素材で作製された回収容器を用いることができる。この場合、回収した核酸溶液の濃度を、他の容器に移し替えずに測定できる。260nmに吸収のない素材は、例えば石英ガラス等が挙げられるがそれに限定されるものではない。

10

【0136】

上記の、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程は、工程を自動で行う自動装置を用いて行うことが好ましい。それにより、操作が簡便化および迅速化だけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の、核酸を得ることが可能になる。

【0137】

以下に、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程を自動で行う自動装置の例を示すが、自動装置はこれの限定されるものではない。

20

【0138】

自動装置は、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用い、該核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入し加圧して該試料液中の核酸を前記核酸吸着性多孔性膜に吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して不純物を除去した後、前記核酸分離精製カートリッジに、回収液を分注し核酸吸着性多孔性膜に吸着した核酸を脱着して回収液とともに回収する、分離精製動作を自動的に行う核酸分離精製装置であって、前記核酸分離精製カートリッジ、前記試料液および洗浄液の排出液を収容する廃液容器および前記核酸を含む回収液を収容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収液を分注する分注機構とを備えてなることを特徴とするものである。

30

【0139】

前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、該スタンドに上下移動可能に支持され前記核酸分離精製カートリッジを保持するカートリッジホルダーと、該カートリッジホルダーの下で前記核酸分離精製カートリッジに対する位置を交換可能に前記廃液容器および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなるものが好適である。

【0140】

また、前記加圧エア供給機構は、下端部より加圧エアを噴出するエアノズルと、該エアノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された前記核酸分離精製カートリッジに対し前記エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、該加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えてなるものが好適である。

40

【0141】

また、前記分注機構は、前記洗浄液を分注する洗浄液分注ノズルと、前記回収液を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄液分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジ上に順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液を収容した洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液を収容した回収液ボトルより回収液を吸引し前記回収液分注ノズル

50

ルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなるものが好適である。

【0142】

上記のような自動装置によれば、核酸分離精製カートリッジ、廃液容器および回収容器を保持する搭載機構と、核酸分離精製カートリッジに加圧工アを導入する加圧工ア供給機構と、核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収液を分注する分注機構とを備え、核酸吸着性多孔性膜部材を備えた核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入加圧し核酸を核酸吸着性多孔性膜部材に吸着させた後、洗浄液を分注して不純物を洗浄排出した後、回収液を分注して核酸吸着性多孔性膜部材に吸着した核酸を分離して回収する核酸分離精製工程を自動的に行って短時間で効率よく試料液の核酸を自動的に分離精製できる機構をコンパクトに構成することができる。

10

【0143】

また、前記搭載機構を、スタンドと、核酸分離精製カートリッジを保持する上下移動可能なカートリッジホルダーと、廃液容器および回収容器を交換可能に保持する容器ホルダーとを備えて構成すると、核酸分離精製カートリッジおよび両容器のセット並びに廃液容器と回収容器の交換が簡易に行える。

【0144】

また、前記加圧工ア供給機構を、エアノズルと、該エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えて構成すると、簡易な機構で確実な加圧工アの供給が行える。

【0145】

また、前記分注機構を、洗浄液分注ノズルと、回収液分注ノズルと、核酸分離精製カートリッジ上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液ボトルより回収液を吸引し回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えて構成すると、簡易な機構で順次洗浄液および回収液の分注が行える。

20

【0146】

以下に、自動装置の形態を図面に沿って説明する。図1は一つの実施の形態における核酸抽出装置のカバーを除去した状態を示す斜視図、図2は自動装置の概略機構図、図3は搭載機構におけるラックの斜視図、図4はラックの使用状態を示す斜視図、図5は核酸分離精製の工程図、図6は核酸分離精製カートリッジの斜視図である。

30

【0147】

一実施形態の自動装置1の機構を説明する前に、この自動装置1は、図6に示すような核酸分離精製カートリッジ11(核酸吸着性多孔性膜カートリッジ)を用いて試料液中の核酸を抽出するものである。この核酸分離精製カートリッジ11は、上端が開いた筒状本体11aの底部に核酸吸着性多孔性膜部材11bが保持され、筒状本体11aの核酸吸着性多孔性膜部材11bより下方部位に口ート状に形成され、下端中心部に細管ノズル状の排出部11cが所定長さで突出形成され、筒状本体11aの側面両側に縦方向の突起11dが形成されてなる。上部開口より後述の試料液、洗浄液、回収液が分注され、上部開口より加圧工アが導入され、各液を核酸吸着性多孔性膜部材11bを通して排出部11cより後述の廃液容器12または回収容器13に流下排出する。なお、図示の場合、筒状本体11aは上部と下部に分割され嵌着する構造となっている。

40

【0148】

そして、自動装置1は基本的に図5(a)~(g)に示すような核酸分離精製工程によって核酸の核酸分離精製を行う。まず図5(a)工程で、廃液容器12上に位置する核酸分離精製カートリッジ11に溶解処理された核酸を含む試料液Sを注入する。次に図5(b)工程で、核酸分離精製カートリッジ11に加圧工アを導入して加圧し、核酸吸着性多孔性膜部材11bを通して試料液Sを通過させ、この核酸吸着性多孔性膜部材11bに核酸を吸着させ、通過した液状成分は廃液容器12に排出する。

【0149】

次に図5(c)工程で核酸分離精製カートリッジ11に洗浄液Wを自動分注し、(d)工程

50

で核酸分離精製カートリッジ 11 に加圧工アを導入して加圧し、核酸吸着性多孔性膜部材 11b に核酸を保持したままその他の不純物の洗浄除去を行い、通過した洗浄液 W は廃液容器 12 に排出される。この (c) 工程および (d) 工程を複数回繰り返してもよい。

【0150】

その後、(e) 工程で核酸分離精製カートリッジ 11 の下方の廃液容器 12 を回収容器 13 に交換してから、(f) 工程で核酸分離精製カートリッジ 11 に回収液 R を自動分注し、(g) 工程で核酸分離精製カートリッジ 11 に加圧工アを導入して加圧し、核酸吸着性多孔性膜部材 11b と核酸の結合力を弱め、吸着されている核酸を離脱させて、核酸を含む回収液 R を回収容器 13 に排出し回収する。

【0151】

前記自動機 1 は、図 1 および図 2 に示すように、装置本体 2 に、複数の核酸分離精製カートリッジ 11、廃液容器 12 および回収容器 13 を保持する搭載機構 3 と、核酸分離精製カートリッジ 11 に加圧工アを導入する加圧工ア供給機構 4 と、核酸分離精製カートリッジ 11 に洗浄液 W および回収液 R を分注する分注機構 5 などを備えてなる。次に各機構 3 ~ 5 を具体的に説明する。

【0152】

< 搭載機構 >

搭載機構 3 は、装置本体 2 の前方下部に搭載台 21 を備え、この搭載台 21 上に複数の核酸分離精製カートリッジ 11、廃液容器 12 および回収容器 13 を保持したラック 6 が載置される。ラック 6 は、図 3 に示すように、スタンド 61 とカートリッジホルダー 62 と容器ホルダー 63 とを備える。スタンド 61 は両側の柱状部 61a に上下移動可能にカートリッジホルダー 62 を保持し、柱状部 61a の間の下部の底板 61b 上に前後移動可能に容器ホルダー 63 を保持している。

【0153】

カートリッジホルダー 62 は、前後のプレート材の接合による 2 分割構造に構成され、横方向に延びる保持部 62a の両端に上下方向に延びる支持脚 62b を備える。その支持脚 62b がスタンド 61 の柱状部 61a の上下方向の摺動溝 61c に上下移動可能に挿入され、この支持脚 62b がスタンド 61 に内蔵された付勢部材 (不図示) によって上方に付勢されている。保持部 62a には複数の保持孔 62c が並設され、上方より核酸分離精製カートリッジ 11 が挿入され、核酸分離精製カートリッジ 11 の筒状本体 11a の側部両側に形成された突起 11d (図 6 参照) の下端がカートリッジホルダー 62 内の係合部材 (不図示) に係合保持される。係合部材は移動可能で、移動時には突起 11d との係合を解除して核酸分離精製カートリッジ 11 を全部同時に下方に落下廃棄するようになっている。

【0154】

このカートリッジホルダー 62 は上面の両側にピン孔 62d を備え、使用状態では後述の位置決め手段としての押えピン 49 (図 1 参照) の先端 49a が係合して下方に押し下げられる。図 3 のようにカートリッジホルダー 62 が上昇した位置では、カートリッジホルダー 62 に保持された核酸分離精製カートリッジ 11 の排出部 11c の下端は容器ホルダー 63 にセットされた廃液容器 12 および回収容器 13 より上方に位置しているが、図 4 に示すように、カートリッジホルダー 62 が下降した際には核酸分離精製カートリッジ 11 の排出部 11c が廃液容器 12 または回収容器 13 の内部に所定量挿入されるように設定されている。

【0155】

容器ホルダー 63 は、横方向に延びる廃液容器保持孔 63a と回収容器保持孔 63b とを平行 2 列に備え、後側の廃液容器保持孔 63a に複数の廃液容器 12 が、前側の回収容器保持孔 63b に複数の回収容器 13 がそれぞれ列状に保持される。廃液容器保持孔 63a および回収容器保持孔 63b はカートリッジホルダー 62 の保持孔 62c と等ピッチで等位置に配設され、保持された各核酸分離精製カートリッジ 11 の下方にそれぞれ廃液容器 12 および回収容器 13 が位置するように設定されている。この廃液容器 12 と回収容

10

20

30

40

50

器 1 3 とは混同防止のためにサイズ、形状等が異なったものを使用するのが好ましい。

【 0 1 5 6 】

上記容器ホルダー 6 3 はスタンド 6 1 に内蔵された不図示の付勢部材によって前方に付勢されている。容器ホルダー 6 3 の容器交換移動（前後動）は、搭載台 2 1 に設置された作動部材 3 1（図 2 参照）が、スタンド 6 1 の底板 6 1 b に形成された開口を通して、容器ホルダー 6 3 の底部の係合孔（不図示）に係合されて行われる。容器交換モータ 3 2（D C モータ）の駆動に応じた作動部材 3 1 の移動動作に応じて容器ホルダー 6 3 が後退移動され、カートリッジホルダー 6 2 の下方に回収容器 1 3 が位置するように作動する。非作動時には廃液容器 1 2 がカートリッジホルダー 6 2 の下方に位置するように不図示の付勢部材で付勢されている。上記容器交換モータ 3 2 の作動は位置センサ 3 3 a、3 3 b の検出に応じて制御される。

10

【 0 1 5 7 】

< 加圧エア供給機構 >

加圧エア供給機構 4 は、図 1 および図 2 に示すように、前記搭載機構 3 のラック 6 に対して昇降移動する加圧ヘッド 4 0 と、該加圧ヘッド 4 0 に 1 列に並んで設置された複数（図の場合 8 個）のエアノズル 4 1 と、加圧エアを発生するエアポンプ 4 3 と、リリーフバルブ 4 4 と、各エアノズル 4 1 に設置され個別に開閉する開閉バルブ 4 5 と、各エアノズル 4 1 に設置された圧力センサ 4 6 を備え、順次核酸分離精製カートリッジ 1 1 に加圧エアを送給する。

【 0 1 5 8 】

前記加圧ヘッド 4 0 は、装置本体 2 の中間フレーム 2 2 と上フレーム 2 3 との間に上下方向に設置されたガイドロッド 2 4 に上下移動可能に保持されている。同様に上下方向に設置されたボールネジ 2 5 に加圧ヘッド 4 0 に設置されたボールナット 4 0 a が螺合し、昇降モータ 4 7（パルスモータ）の駆動に伴うタイミングベルト、プーリを介したボールネジ 2 5 の回転により加圧ヘッド 4 0 が、フォトセンサ 4 8 a ~ 4 8 c の検出に伴う制御により昇降移動される。加圧ヘッド 4 0 の両側には押えピン 4 9 を有し、この押えピン 4 9 はスプリング 4 9 b で下方に付勢されて上下移動可能で、先端 4 9 a がカートリッジホルダー 6 2 の上面のピン孔 6 2 d に係合して位置を規制して押えるようになっている。

20

【 0 1 5 9 】

上記押えピン 4 9 は、カートリッジホルダー 6 2 を押圧作動している状態で、後述の洗浄液分注ノズル 5 1 w および回収液分注ノズル 5 1 r の横方向移動と干渉しないように、カートリッジホルダー 6 2 の前側位置を押えるように配設されている。

30

【 0 1 6 0 】

エアノズル 4 1 は加圧ヘッド 4 0 にそれぞれ上下移動可能にかつ下方に付勢されて設置され、その下方にはエアノズル 4 1 に対応した連通孔 4 2 a（図 2 参照）が開口されたシート状のシール材 4 2 が配設され、加圧ヘッド 4 0 が下降移動した際に、カートリッジホルダー 6 2 にセットされた核酸分離精製カートリッジ 1 1 の上端開口を、エアノズル 4 1 先端でシール材 4 2 を介して押圧して密閉し、連通孔 4 2 a を通して核酸分離精製カートリッジ 1 1 内へ加圧エアが送給可能となる。

【 0 1 6 1 】

リリーフバルブ 4 4 はエアポンプ 4 3 と開閉バルブ 4 5 との間の通路のエアを排出する際に大気開放作動される。開閉バルブ 4 5 は選択的に開作動されて、エアポンプ 4 3 からの加圧エアに対応するエアノズル 4 1 を経て核酸分離精製カートリッジ 1 1 内に導入するようにエア回路が構成されている。圧力センサ 4 6 は各エアノズル 4 1 に設置され、核酸分離精製カートリッジ 1 1 の内圧を個別に検出するものであり、検出圧力が所定値（例えば 1 0 0 k P a）となったときに対応する開閉バルブ 4 5 を開作動して加圧エアの送給を停止したり、また、圧力が所定値以下に低下したことの検出により液排出終了を判定する制御などが行われる。

40

【 0 1 6 2 】

< 分注機構 >

50

分注機構 5 は、ラック 6 上を横方向に移動可能なノズル移動台 50 に設置された洗浄液分注ノズル 51w および回収液分注ノズル 51r と、洗浄液ボトル 56w に収容された洗浄液 W を洗浄液分注ノズル 51w に給送する洗浄液供給ポンプ 52w と、回収液ボトル 56r に収容された回収液 R を回収液分注ノズル 51r に給送する回収液供給ポンプ 52r と、搭載台 21 に設置された廃液ボトル 57 などを備える。

【0163】

ノズル移動台 50 は、装置本体 2 の縦壁 26 に水平方向に設置されたガイドレール 27 に保持されて横方向に移動可能であり、その移動が不図示のノズル移動モータ（パルスモータ）によって各核酸分離精製カートリッジ 11 上で順次停止し、復帰状態では廃液ボトル 57 上に停止するように駆動制御される。洗浄液分注ノズル 51w および回収液分注ノズル 51r は先端が下方に向けて屈曲され、洗浄液分注ノズル 51w は切替弁 55w を介して洗浄液供給ポンプ 52w に接続され、洗浄液供給ポンプ 52w は切替弁 55w を介して洗浄液ボトル 56w に接続され、回収液分注ノズル 51r は切替弁 55r を介して回収液供給ポンプ 52r に接続され、回収液供給ポンプ 52r は切替弁 55r を介して回収液ボトル 56r に接続されている。洗浄液ボトル 56w および回収液ボトル 56r はそれぞれ装置本体 2 の側部に装着される。洗浄液供給ポンプ 52w および回収液供給ポンプ 52r はシリンジポンプで構成され、そのピストン部材がそれぞれバックモータ 53w、53r（パルスモータ）によってセンサ 54w、54r の位置検出に基づいて所定量の洗浄液 W および回収液 R を分注するように駆動制御される。

【0164】

すなわち、洗浄液 W または回収液 R を分注する場合には、切替弁 55w または 55r を洗浄液ボトル 56w または回収液ボトル 56r 側に切り替え、ポンプモータ 53w または 53r を駆動して洗浄液供給ポンプ 52w または回収液供給ポンプ 52r のピストン部材を後退作動させ、洗浄液 W または回収液 R を洗浄液供給ポンプ 52w または回収液供給ポンプ 52r の内部に吸引収容し、続いて切替弁 55w または 55r を洗浄液分注ノズル 51w または回収液分注ノズル 51r 側へ切り替え、ポンプモータ 53w または 53r を駆動して洗浄液供給ポンプ 52w または回収液供給ポンプ 52r のピストン部材を押込作動させ、廃液ボトル 57 に対して通路内のエアを排出するまで洗浄液または回収液を洗浄液分注ノズル 51w または回収液分注ノズル 51r より吐出させた後、洗浄液供給ポンプ 52w または回収液供給ポンプ 52r の駆動を停止させる。その後、洗浄液分注ノズル 51w または回収液分注ノズル 51r を核酸分離精製カートリッジ 11 上に移動させてから、洗浄液供給ポンプ 52w または回収液供給ポンプ 52r の駆動量を制御して所定量の洗浄液 W または回収液 R を核酸分離精製カートリッジ 11 へ分注するものである。

【0165】

前記洗浄液ボトル 56w および回収液ボトル 56r は、容器本体 56wb、56rb とキャップ 56wu、56ru よりなり、両キャップ 56wu、56ru にはそれぞれ細バインプ状の吸引チューブ 58w、58r が設置され、該吸引チューブ 58w、58r の下端が容器本体 56wb、56rb の底部近傍に開口して、洗浄液供給ポンプ 52w または回収液供給ポンプ 52r の作動に応じて洗浄液 W、回収液 R を吸い上げるようになっている。また、キャップ 56wu、56ru には吸引に応じて空気を容器本体 56wb、56rb 内に導入する不図示のバインプ（開口でもよい）が設けられる。なお、洗浄液ボトル 56w の容器本体 56wb は、回収液ボトル 56r の容器本体 56rb より液の消費量が多いことから全高が大きく形成され、それに応じて吸引チューブ 58w も長く形成され、キャップ 56wu、56ru に対する口部のねじは同径である。

【0166】

両ボトル 56w、56r の装置本体 2 への装着は、吸引チューブ 58w、58r が固着された各キャップ 56wu、56ru が止め具 28、28 によってそれぞれ装置本体 2 の中間フレーム 22 に取り付けられ、このキャップ 56wu、56ru に対して容器本体 56wb、56rb を下方より、口部に吸引チューブ 58w、58r を挿入してねじ込んで装着するようになっている。これは、吸引チューブ 58w、58r が設置されたキャップ

10

20

30

40

50

56wu, 56ruを容器本体56wb, 56rbより外して洗浄液W、回収液Rを補給するようにした場合、外したキャップ56wu, 56ruをテーブル等に置いたときに、チューブ58w, 58rの先端に物質が付着して洗浄液W・回収液Rに混入するのを防止するためである。

【0167】

そして、特に容器高さが大きい洗浄液ボトル56wでは、容器本体56wbを外した際における吸引チューブ58wの下端と、その下方の装置本体2を載置したテーブル面との間の距離Hは、容器本体56wbの高さhより大きくするようにしている。つまり、止め具28によるキャップ56wuの設置高さを、容器本体56wbの高さhの約2倍以上にテーブル面より高い位置にする必要がある。これにより、吸引チューブ58wを備えた固定キャップ56wuに対し、容器本体56wbの交換、液の補充作業が容易に行える。回収液ボトル56rについても同様である。

【0168】

次に、上記のような各機構3～5は、装置本体2の上部に設置された操作パネル7の入力操作に対応し、連係された不図示の制御ユニットにより内蔵されたプログラムに基づいて駆動制御される。

【0169】

上記核酸核酸分離精製装置1による核酸分離精製動作を具体的に説明する。まず搭載機構3のラック6におけるカートリッジホルダー62に核酸分離精製カートリッジ11をセッとし、容器ホルダー63に廃液容器12および回収容器13をそれぞれセッとし、このラック6を装置本体2の搭載台21に載置して準備を行う。次に、溶解処理された試料液Sをビペット等によって各核酸分離精製カートリッジ11に順次注入する。なお、装置1に搭載する前のラック6にセッした後またはセッする前の核酸分離精製カートリッジ11に試料液Sを先に注入するようにしてもよい。

【0170】

その後、操作パネル7の操作によって装置を作動させると、加圧エア供給機構4の昇降モータ47の駆動によって加圧ヘッド40が下降移動し、押えピン49の先端49aがカートリッジホルダー62のピン孔62dに係合して押さえつけて、このカートリッジホルダー62を下降させて位置を規制すると共に、核酸分離精製カートリッジ11の下端排出部11cを図4のように廃液容器12内に所定量挿入させて、排出液が飛散等によって外部に漏れてコンタミネーションの原因とならないようにする。さらに加圧ヘッド40が下降移動してシール材42を介して各エアノズル41の下端部が核酸分離精製カートリッジ11の上端開口に圧接して密閉する。前記押えピン49がカートリッジホルダー62の位置を規制していることで、各核酸分離精製カートリッジ11に対し各エアノズル41が正確に圧接して確実な密閉が確保できる。

【0171】

その後、加圧エアの供給が行われるもので、全部の開閉バルブ45が開状態エアポンプ43が駆動され、まず1番目の開閉バルブ45が開作動される。そして、1番目のエアノズル41を通して1番目の核酸分離精製カートリッジ11にエアポンプ43からの加圧エアが供給され、その圧力センサ46の検出によって所定圧力に上昇すると1番目の開閉バルブ45を開作動するのちに、2番目の開閉バルブ45が開作動されて2番目のエアノズル41を通して2番目の核酸分離精製カートリッジ11に加圧エアが供給される。この動作を順に繰り返して全ての核酸分離精製カートリッジ11に圧力を加える。圧力が作用した試料液Sは、核酸吸着性多孔性膜部材11bを通過して核酸が吸着保持され、その他の液状成分は下端部の排出部11cより廃液容器12に排出される。試料液Sが全て核酸吸着性多孔性膜部材11bを通過すると圧力が液排出完了圧力以下に低下し、各圧力センサ46によって全部の核酸分離精製カートリッジ11で核酸分離精製終了が検出されると、加圧ヘッド40が上昇作動される。

【0172】

次に、洗浄処理に移行するが、上記加圧エア供給後の加圧ヘッド40の上昇は、エアノ

ズル４１が核酸分離精製カートリッジ１１より離れ、ノズル移動台５０の移動が許容できる高さまで上昇した位置で停止し、押えピン４９がカートリッジホルダー６２を押さえつけ、核酸分離精製カートリッジ１１の下端が廃液容器１２内に挿入されている図４の状態を保持して行う。そして、ノズル移動台５０を移動させて洗浄液分注ノズル５１ｗを１番目の核酸分離精製カートリッジ１１上に停止させて洗浄液Ｗを所定量分注し、ノズル移動台５０を次の核酸分離精製カートリッジ１１に移動させて順次洗浄液Ｗを分注する。全部の核酸分離精製カートリッジ１１への洗浄液Ｗの分注が終了すると、加圧ヘッド４０が下降移動し、各工アノズル４１の下端部がシール材４２を介して核酸分離精製カートリッジ１１の上端開口に圧接して密閉してから、前述と同様に開閉バルブ４５が順次開作動されて各核酸分離精製カートリッジ１１に加圧エアが供給される。圧力が作用した洗浄液Ｗは、核酸吸着性多孔性膜部材１１ｂを通過して核酸以外の不純物の洗浄除去を行い、洗浄液Ｗは下端部の排出部１１ｃより廃液容器１２に排出される。全部の核酸分離精製カートリッジ１１における洗浄液Ｗが全て核酸吸着性多孔性膜部材１１ｂを通過して排出されると、加圧ヘッド４０が初期の位置まで上昇作動される。洗浄処理を複数回行う場合には上記動作を繰り返す。

10

【０１７３】

次に、回収処理に移行する。まず洗浄処理後の前記加圧ヘッド４０の上昇により、押えピン４９が上昇してラック６のカートリッジホルダー６２も上昇移動し、核酸分離精製カートリッジ１１の下端排出部１１ｃが廃液容器１２より上方へ移動した後、搭載機構３の作動部材３１を作動させて容器ホルダー６３を後退移動させ、核酸分離精製カートリッジ１１の下方に回収容器１３を位置させる容器交換を行う。

20

【０１７４】

続いて、加圧ヘッド４０が下降移動し、押えピン４９の先端がカートリッジホルダー６２のピン孔６２ｄに係合して押さえつけ、核酸分離精製カートリッジ１１の下端が回収容器１３内に挿入されている状態を保持する。そして、ノズル移動台５０を移動させて回収液分注ノズル５１ｒを１番目の核酸分離精製カートリッジ１１上に停止させて回収液Ｒを所定量分注し、ノズル移動台５０を次の核酸分離精製カートリッジ１１に移動させて順次回収液Ｒの分注を行う。全部の核酸分離精製カートリッジ１１への回収液Ｒの分注が終了すると、前述と同様にさらに加圧ヘッド４０が下降し、各工アノズル４１の下端部をシール材４２を介して核酸分離精製カートリッジ１１の上端開口に圧接させて密閉してから、開閉バルブ４５が順次開作動されて各核酸分離精製カートリッジ１１に加圧エアが供給される。圧力が作用した回収液Ｒは、核酸吸着性多孔性膜部材１１ｂを通過してそれに吸着されている核酸を離脱させて、回収液Ｒとともに核酸が下端部の排出部１１ｃより回収容器１３に排出される。全部の核酸分離精製カートリッジ１１における回収液Ｒが全て回収容器１３に排出されると、加圧ヘッド４０が上昇作動され、一連の動作が終了する。

30

【０１７５】

核酸分離精製動作が終了したラック６は搭載台２１より下ろされ、核酸分離精製カートリッジ１１および廃液容器１２はカートリッジホルダー６２および容器ホルダー６３より取り出されて廃棄され、一方、回収容器１３は容器ホルダー６３より取り出され、必要に応じて蓋がされて、次の核酸分析処理等が施される。

40

【０１７６】

なお、本実施形態では、核酸分離精製カートリッジ１１を複数搭載しているが、これに限定されるものではなく、核酸分離精製カートリッジ１１を１本としても適用が可能である。

【実施例】

【０１７７】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例１】

(１) 核酸精製カートリッジの作成

50

内径7mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸分離精製カートリッジ用容器をハイインバクトポリスチレンで作成する。アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物の核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜(膜厚=70 μ m、平均孔径=1.2 μ m)を、上記の、核酸分離精製カートリッジ用容器の核酸吸着性多孔膜を収容する部分に収容し、核酸分離精製カートリッジとする。

【0178】

(2) 核酸可溶化試薬(RNA用)及び洗浄液の調製

表1に示す処方の核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0179】

【表1】

(核酸可溶化試薬溶液)

| | |
|----------------------------|--------|
| 塩酸 Guanidini (ライフテクノロジー社製) | 382g |
| Tris (ライフテクノロジー社製) | 12.1g |
| Triton X-100 (ICN製) | 10g |
| 蒸留水 | 1000ml |

(洗浄液)

| |
|---------------|
| 100mM NaCl |
| 10mM Tris-HCl |
| 65%エタノール |

【0180】

(3) 核酸分離精製操作

ガン化人骨髄細胞(HL60)培養液を用意する。この培養液を細胞数が 1×10^6 個になるよう採取し、5分間遠心分離操作を行い、細胞を沈殿させ上澄みを除き、細胞を得る。上記HL60細胞(1×10^6 個)にRNA可溶化試薬溶液200 μ lを添加して攪拌、続いてエタノール200 μ lを加え攪拌することで、RNAを含む試料溶液を作製する。該RNAを含む試料溶液を、上記(1)で作製した、アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物の核酸吸着性多孔膜を備えた、核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した該RNAを含む試料溶液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させることで、上記核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合して、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収した。

【0181】

(4) RNAの分離精製の確認

回収液を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。その結果を図7に示す(図7におけるマーカーは、READY-LOAD(商品名)1kb Plus NA Ladder)。図7の結果からわかるように、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物からなる核酸吸着性多孔膜を備えた核酸分離精製カートリッジと、加圧装置を用いて、RNAを回収効率よく分離精製でき

る。

【0182】

[実施例2]

(1) 核酸精製カートリッジの作成

実施例1で作製した、内径7mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸分離精製カートリッジ用容器に、アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化した処理した核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜(膜厚=70 μ m、平均孔径=5.0 μ m)を酸化した核酸吸着性多孔膜を、上記容器の核酸吸着性多孔膜を収容する部分に収容し、核酸分離精製カートリッジとする。

上記の酸化した処理は、2Nの水酸化ナトリウムの水溶液にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を20分間浸漬することで行う。この処理の後で、多孔性膜の平均孔径は5.0 μ mから2.5 μ mに減少した。

【0183】

(2) 核酸分離精製操作

人全血検体200 μ lに、実施例1で作製した核酸可溶性試薬200 μ lと、プロテアーゼ(SIGMA社製、"Protease" Type XXIV Bacterial)溶液20 μ lを添加して、60℃で10分間インキュベートする。インキュベート後、エタノール200 μ lを加え攪拌することで、核酸を含む試料溶液を作製する。該核酸を含む試料溶液を、上記(1)で作製した、アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物の酸化した核酸吸着性多孔膜を備えた、核酸分離精製カートリッジの開口に注入し、続いて上記の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させることで、上記核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記の開口に、実施例1で作製した洗浄液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記の開口に回収液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記の開口に圧力発生装置を結合して、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、上記核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収した。

【0184】

(3) 核酸の分離精製の確認

回収液を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。その結果を図8に示す(マーカーは図7と同じ)。図8の結果からわかるように、アセチル値の異なるアセチルセルロースの混合物の酸化物からなる核酸吸着性多孔膜を備えた核酸分離精製カートリッジと、加圧装置を用いて、核酸を回収効率よく分離精製できる。

【0185】

[実施例3]

(1) 核酸精製カートリッジの作成

内径7mm、核酸吸着性多孔性膜を収容する部分を持つ核酸精製カートリッジをハイインパクトポリスチレンで作成する。

【0186】

核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースの多孔性膜を酸化した処理した多孔膜を使用し、上記(1)で作成した核酸精製カートリッジの核酸吸着性多孔膜収納部に収容する。

上記の酸化した処理は、2Nの水酸化ナトリウムの水溶液にトリアセチルセルロースの多孔性膜を20分間浸漬することで行う。この処理の後で、多孔性膜の平均孔径は5.0 μ mから2.5 μ mに減少した。

【0187】

10

20

30

40

50

(2) 核酸可溶性試薬溶液及び洗浄液の調製

表2に示す処方の核酸可溶性試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0188】

【表2】

(核酸可溶性試薬溶液)

| | |
|-----------------------|---------|
| 塩酸グアニジン (ライフテクノロジー社製) | 382 g |
| Tris (ライフテクノロジー社製) | 12.1 g |
| TritonX-100 (ICN製) | 10 g |
| 蒸留水 | 1000 ml |

10

(洗浄液)

| | |
|----------------|----------|
| 10 mM Tris-HCl | 65%エタノール |
|----------------|----------|

【0189】

(3) 核酸分離精製操作

人全血200 μ lに核酸可溶性試薬溶液200 μ lとプロテアーゼ (SIGMA社製、"Protease" Type XXIV Bacterial) 溶液20 μ lを添加して60℃で10分間インキュベートする。インキュベート後、エタノール200 μ lを加え、攪拌する。攪拌後、膜の厚さが70 μ mの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いて、上記(1)及び(2)で作成した核酸吸着性多孔性膜を有する核酸精製カートリッジの開口に注入し、続いて上記の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜に通過させることで、核酸吸着性多孔性膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記の開口に洗浄液を注入し、上記の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記の開口に回収液を注入し、核酸分離精製カートリッジの上記の開口に圧力差発生装置を結合して核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

20

30

【0190】

[比較例1]

膜の厚さが70 μ mの多孔質性膜を核酸吸着性多孔質膜として用いる代わりに、膜の厚さが600 μ mの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる以外は、実施例3と同じ条件で、操作を行う。

【0191】

(4) 核酸の精製操作の時間に関する評価

実施例3と比較例1の実験を10回繰り返す。その分離精製工程に要した時間の平均値をとり、膜の厚さが70 μ mの多孔性膜を用いたときに要した時間を1として、分離精製工程に要する時間の差異を比較する。その結果を表3に示す。

40

【0192】

【表3】

| 多孔性膜の厚さ [μ m] | 相対所要時間 |
|--------------------|--------|
| 70 | 1 |
| 600 | 10 |

50

【0193】

表3の結果から明らかなように、本発明の方法を用いることにより、核酸を迅速に回収及び精製できることが分かる。

【0194】

【実施例4】

膜の厚さが70 μ mの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、膜の厚さが70 μ mであって、最大孔径と最小孔径の比が2以上の多孔質膜を多孔質膜として用いる以外は、実施例3と同じ条件で、操作を行う。

【0195】

【比較例2】

膜の厚さが70 μ mであって、最大孔径と最小孔径の比が2以上の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、直径0.2 μ mの高分子ビーズを用いる以外は、実施例4と同じ条件で、操作を行う。

【0196】

(1) 核酸の精製操作の時間に関する評価

実施例4と比較例2の実験を5回繰り返す。核酸精製工程において、液を通過させて核酸を回収できたか、あるいは目詰まりを起こして精製ができなくなったかの判定を目視で行った。その結果を表4に示す。

【0197】

【表4】

| 評価回数 | 実施例5 | 比較例3 |
|------|------|------|
| 1 | ○ | × |
| 2 | ○ | × |
| 3 | ○ | × |
| 4 | ○ | × |
| 5 | ○ | × |

○；液を通過して核酸回収できた、×；目詰まり発生

【0198】

表4の結果から明らかなように、本発明の方法を用いることにより、核酸を迅速に、目詰まりを起こさずに回収及び精製できることが分かる。

【0199】

【実施例5】

膜の厚さが70 μ mの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、膜の厚さが70 μ mであって空隙率が70%である多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる以外は、実施例3と同じ条件で、操作を行う。

【0200】

【比較例3】

膜の厚さが70 μ mであって空隙率が70%である多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、空隙率が58%および80%の多孔性膜を用いる以外は、実施例5と同じ条件で、操作を行う。

【0201】

(1) 核酸の回収量に関する評価

実施例5と比較例3の実験を10回繰り返す。その精製工程の結果回収できた核酸の量の平均値をとり、空隙率が70%である多孔性膜を用いたときに回収した核酸の量を1として、回収した核酸の量の差異を比較する。その結果を表5に示す。

なお、多孔性膜の空隙率は、切り取った多孔性膜の断面積と膜の厚さから求められる体

10

20

30

40

50

積に多孔性膜の材料となる物質の密度を乗じて求めた想定質量と、膜の実際の質量を比較することによって、多孔性膜中の空間の体積率として求めた。

【0202】

【表5】

| 多孔性膜の空隙率 [%] | 相対回収量 |
|--------------|-------|
| 58 | 0.4 |
| 70 | 1 |
| 80 | 1.1 |

10

【0203】

表5の結果から明らかなように、本発明の方法を用いることにより、核酸を効率よく回収及び精製できることが分かる。

【0204】

【実施例6】

膜の厚さが70 μ mの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、膜の厚さが70 μ mであってバブルポイントが4.5kgf/cm²の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる以外は、実施例3と同じ条件で、操作を行う。

【0205】

20

【比較例4】

膜の厚さが70 μ mであってバブルポイントが4.5kgf/cm²の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、バブルポイントが5.5kgf/cm²および2.0kgf/cm²の多孔性膜を用いる以外は、実施例6と同じ条件で、操作を行う。

【0206】

(1) 核酸の精製操作の時間に関する評価

実施例6と比較例4の実験を10回繰り返す。その精製工程に要した時間の平均値をとり、バブルポイント4.5kgf/cm²の多孔性膜を用いたときに要した時間を1として、精製工程に要する時間の差異を比較する。その結果を表6に示す。

30

【0207】

【表6】

| 多孔性膜のバブルポイント [kgf/cm ²] | 相対所要時間 |
|-------------------------------------|--------|
| 5.5 | 1.6 |
| 4.5 | 1 |
| 2.0 | 0.4 |

【0208】

表6の結果から明らかなように、本発明の方法を用いることにより、核酸を迅速に回収及び精製できることが分かる。

40

【0209】

【実施例7】

膜の厚さが70 μ mの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、膜の厚さが70 μ mであって圧力損失が75kPaの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる以外は、実施例3と同じ条件で、操作を行う。

【0210】

【比較例5】

膜の厚さが70 μ mであって圧力損失が75kPaの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、圧力損失が90kPaおよび20kPaの多孔性膜を用いる以外は

50

、実施例 7 と同じ条件で、操作を行う。

【0211】

(1) 核酸の精製操作の時間に関する評価

実施例 7 と比較例 5 の実験を 10 回繰り返す。その精製工程に要した時間の平均値をとり、圧力損失が 75 kPa の多孔性膜を用いたときに要した時間を 1 とし、精製工程に要する時間の差異を比較する。その結果を表 7 に示す。

なお、多孔性膜の圧力損失は、多孔性膜を乾燥状態から一度水を通過させて十分に水になじませてから測定を行った。

【0212】

【表 7】

| 多孔性膜の圧力損失 [kPa] | 相対所要時間 |
|-----------------|--------|
| 90 | 2 |
| 75 | 1 |
| 20 | 0.3 |

10

【0213】

表 7 の結果から明らかのように、本発明の方法を用いることにより、核酸を迅速に回収及び精製できることが分かる。

20

【0214】

【実施例 8】

膜の厚さが 70 μm の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、膜の厚さが 70 μm であって、25℃で 1 kg / cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が膜 1 cm^2 あたり 1 分間で 60 mL の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる以外は、実施例 3 と同じ条件で、操作を行う。

【0215】

【比較例 6】

膜の厚さが 70 μm であって、25℃で 1 kg / cm^2 の圧力で水を通過させたときの透水量が膜 1 cm^2 あたり 1 分間で 60 mL の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、透水量が膜 1 cm^2 あたり 1 分間で 80 mL および 30 mL の多孔性膜を用いる以外は、実施例 8 と同じ条件で、操作を行う。

30

【0216】

(1) 核酸の精製操作の時間に関する評価

実施例 8 と比較例 6 の実験を 10 回繰り返す。その精製工程に要した時間の平均値をとり、透水量が膜 1 cm^2 あたり 1 分間で 60 mL の多孔性膜を用いたときに要した時間を 1 とし、精製工程に要する時間の差異を比較する。その結果を表 8 に示す。

なお、多孔性膜の透水量は、多孔性膜を乾燥状態から一度水を通過させて十分に水になじませてから測定を行った。温度は 25℃、圧力は 1 kg / cm^2 であった。

【0217】

【表 8】

| 多孔性膜の透水量 [mL / (分・ cm^2)] | 相対所要時間 |
|-------------------------------------|--------|
| 30 | 2 |
| 60 | 1 |
| 80 | 0.8 |

40

【0218】

表 8 の結果から明らかのように、本発明の方法を用いることにより、核酸を迅速に回収

50

及び精製できることが分かる。

【0219】

【実施例9】

膜の厚さが70 μ mの多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、膜の厚さが70 μ mであって、核酸の吸着量が0.9 μ g/mg(膜質量)の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる以外は、実施例3と同じ条件で、操作を行う。

【0220】

【比較例7】

膜の厚さが70 μ mであって、核酸の吸着量が0.9 μ g/mg(膜質量)の多孔性膜を核酸吸着性多孔性膜として用いる代わりに、核酸の吸着量が0.5 μ g/mg(膜質量)の多孔性膜を用いる以外は、実施例9と同じ条件で、操作を行う。

10

【0221】

(1) 同膜質量の場合の核酸回収量比較

本発明の方法及び比較例の方法に従って核酸を含む試料溶液から精製した核酸の電気泳動の結果(実施例9及び比較例7)を図9に示す。なお、使用したマーカーは、 λ DNA / HindIII digestである。

図9の結果から明らかにように、本発明の方法を用いることにより、同量の試料溶液から核酸を高収率で回収及び精製できることが分かる。

【0222】

【実施例10】

20

(1) 核酸精製カートリッジの作成

内径7mm、核酸吸着性多孔性膜を収容する部分を持つ核酸分離精製カートリッジ用容器をハイインパクトポリスチレンで作成する。アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した核酸吸着性多孔性膜として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜(膜厚=70 μ m、平均孔径=5.0 μ m)を酸処理した多孔性膜を、上記の、核酸分離精製カートリッジ用容器の核酸吸着性多孔性膜を収容する部分に収容し、核酸分離精製カートリッジとする。

上記の酸処理は、2Nの水酸化ナトリウムの水溶液にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を20分間浸漬することで行う。この処理の前で、多孔性膜の平均孔径は5.0 μ mから2.5 μ mに減少した。

30

【0223】

(2) 核酸可溶化試薬及び洗浄液の調製

表9に示す処方の核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0224】

【表9】

(核酸可溶化試薬溶液)

| | |
|----------------------|--------|
| 塩酸グアニジン(ライフテクノロジー社製) | 382g |
| Tris(ライフテクノロジー社製) | 12.1g |
| TritonX-100(ICN製) | 10g |
| 蒸留水 | 1000ml |

40

(洗浄液)

| |
|---------------|
| 100mM NaCl |
| 10mM Tris-HCl |
| 70%エタノール |

50

【0225】

(3) DNA分離精製操作

人全血検体200 μ lに、実施例1で作製した核酸可溶性試薬200 μ lと、プロテアーゼ(SIGMA社製、"Protease" Type XXIV Bacterial)溶液20 μ lを添加して、60℃で10分間インキュベートする。インキュベート後、エタノール200 μ lを加え攪拌することで、核酸を含む試料溶液を作製する。該核酸を含む試料溶液を、上記(1)で作製した、アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物の核酸吸着性多孔性膜を備えた、核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した該核酸を含む試料溶液を、上記核酸吸着性多孔性膜に通過させることで、上記核酸吸着性多孔性膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。この際、試料溶液が多孔性膜を通過する時間を測定する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に、実施例1で作製した洗浄液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、上記核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力発生装置を結合して、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、上記核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

10

20

【0226】

(3) DNAの回収量の確認

回収液を用いてUV測定を行い、260nmの吸光度(OD)から、回収液中に含まれるDNAの量を求める。

【0227】

[実施例11]

実施例10において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜(膜厚=70 μ m、平均孔径=3.0 μ m)を鹼化処理した多孔性膜を用いる以外は、実施例10と同じ操作を行い、試料溶液が多孔性膜を通過する時間と、回収液中のDNA量を求める。

30

上記の鹼化処理は、2Nの水酸化ナトリウムの水溶液にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を20分間浸漬することで行う。この処理の前で、多孔性膜の平均孔径は3.0 μ mから1.2 μ mに減少した。

【0228】

[比較例8]

実施例10において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を鹼化処理した多孔性膜(膜厚=70 μ m、鹼化処理後の平均孔径=0.8 μ m)を用いる以外は、実施例10と同じ操作を行い、試料溶液が多孔性膜を通過する時間と、回収液中のDNA量を求める。

【0229】

40

[比較例9]

実施例1において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が6:4の多孔性膜を鹼化処理した多孔性膜(膜厚=70 μ m、鹼化処理後の平均孔径=5.6 μ m)を用いる以外は、実施例10と同じ操作を行い、試料溶液が多孔性膜を通過する時間と、回収液中のDNA量を求める。

【0230】

表10に、実施例10、実施例11、比較例8および比較例9で測定した値を示す。

【0231】

【表 10】

| | 試料溶液が多孔性膜を通過する時間 (sec) | 回収DNA量(μ g) |
|--------|---------------------------|------------------|
| 実施例 10 | 8 | 5.4 |
| 実施例 11 | 15 | 5.6 |
| 比較例 8 | 目詰まりにより通過不能 | 0.0 |
| 比較例 9 | 6 | 3.4 |

10

【0232】

表 10 から、本発明の実施例 10 及び実施例 11 では、試料溶液が短時間で多孔性膜を通過することができ、かつ十分量の DNA が回収できることがわかる。一方、比較例 8 では、多孔性膜が試料溶液中の成分で目詰まりしてしまい、試料溶液が多孔膜を通過することができず、DNA を回収することが出来ない。また、比較例 9 では、試料溶液が短時間で多孔性膜を通過することができるが、回収できる DNA の量が十分でない。

【0233】

【実施例 12】

(1) 核酸精製カートリッジの作成

内径 7 mm、核酸吸着性多孔性膜を収容する部分を持つ核酸分離精製カートリッジ用容器をハイインバクトポリスチレンで作成する。アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物を酸処理した核酸吸着性多孔性膜として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が 6 : 4 の多孔性膜 (膜厚 = 70 μ m、平均孔径 = 5.0 μ m) を酸処理した多孔性膜) を、上記の、核酸分離精製カートリッジ用容器の核酸吸着性多孔膜を収容する部分に収容し、核酸分離精製カートリッジとする。

上記の酸処理は、2 N の水酸化ナトリウムの水溶液にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が 6 : 4 の多孔性膜を 20 分間浸漬することで行う。この処理の前後で、多孔性膜の平均孔径は 5.0 μ m から 2.5 μ m に減少した。

【0234】

(2) RNA 可溶性試薬及び洗浄液の調製

表 11 に示す処方の RNA 可溶性試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0235】

【表 11】

(RNA 可溶性試薬溶液)

| | |
|------------------------------|---------|
| 塩酸 Guanidinium (ライフテクノロジー社製) | 382 g |
| Tris (ライフテクノロジー社製) | 12.1 g |
| NP-40 (和光純薬製) | 10 g |
| 蒸留水 | 1000 ml |

40

(洗浄液)

| |
|---------------|
| 100mM NaCl |
| 10mM Tris-HCl |
| 56%エタノール |

【0236】

(3) RNA 分離精製操作

50

ガン化人骨髄細胞 (H L 6 0) 培養液を用意する。この培養液を細胞数が 1×10^6 個になるよう採取し、5 分間遠心分離操作を行い、細胞を沈殿させ上澄みを除き、細胞を得る。上記 H L 6 0 細胞 (1×10^6 個) に RNA 可溶化試薬溶液 $200 \mu\text{l}$ を添加して攪拌、続いてエタノール $200 \mu\text{l}$ を加え攪拌することで、RNA を含む試料溶液を製する。該 RNA を含む試料溶液を、上記 (1) で作製した、アセチル化の異なるアセチルセルロースの混合物の核酸吸着性多孔性膜を備えた、核酸分離精製カートリッジの開口に注入し、続いて上記の開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した該 RNA を含む試料溶液を、上記核酸吸着性多孔性膜に通過させることで、上記核酸吸着性多孔性膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出する。この際、試料溶液が多孔性膜を通過する時間を測定する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの開口に洗浄液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの開口に圧力発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、上記核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの開口に回収液を注入し、上記核酸分離精製カートリッジの開口に圧力発生装置を結合して、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、上記核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

【0237】

(4) RNA の回収量の確認

回収液を用いて UV 測定を行い、 260 nm の吸光度 (OD) から、回収液中に含まれる RNA の量を求める。

【0238】

【比較例 10】

実施例 12 において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が 6 : 4 の多孔性膜を酸化处理した多孔性膜 (膜厚 $= 70 \mu\text{m}$ 、酸化处理後の平均孔径 $= 0.8 \mu\text{m}$) を用いる以外は、実施例 12 と同じ操作を行い、試料溶液が多孔性膜を通過する時間と、回収液中の RNA 量を求める。

【0239】

【比較例 11】

実施例 12 において、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比が 6 : 4 の多孔性膜を酸化处理した多孔性膜 (膜厚 $= 70 \mu\text{m}$ 、酸化处理後の平均孔径 $= 5.6 \mu\text{m}$) を用いる以外は、実施例 12 と同じ操作を行い、試料溶液が多孔性膜を通過する時間と、回収液中の RNA 量を求める。

【0240】

表 12 に、実施例 12、比較例 10 および比較例 11 で測定した値を示す。

【0241】

【表 12】

| | 試料溶液が多孔性膜を通過する時間 (sec) | 回収 RNA 量 (μg) |
|--------|---------------------------|----------------------------|
| 実施例 12 | 16 | 9.6 |
| 比較例 10 | 目詰まりにより通過不能 | 0.0 |
| 比較例 11 | 9 | 6.5 |

【0242】

表 12 から、本発明の実施例 12 では、試料溶液が短時間で多孔性膜を通過することができ、かつ十分な RNA が回収できることがわかる。一方、比較例 10 では、多孔膜が試料溶液中の成分で目詰まりしてしまい、試料溶液が多孔膜を通過することができず、RNA を回収することが出来ない。

また、比較例 11 では、試料溶液が短時間で多孔性膜を通過することができるが、回収

できるRNAの量が十分でないことがわかる。

【図面の簡単な説明】

【0243】

【図1】本発明の一つの実施の形態における核酸核酸分離精製装置のカバーを除去した状態を示す斜視図

【図2】自動装置の概略機構図

【図3】搭載機構におけるラックの斜視図

【図4】ラックの使用状態を示す斜視図

【図5】核酸分離精製動作の工程図

【図6】核酸分離精製カートリッジの斜視図

【図7】本発明の実施に従って核酸を含む試料溶液から分離精製した核酸の電気泳動の結果を示す。

【図8】本発明の実施に従って核酸を含む試料溶液から分離精製した核酸の電気泳動の結果を示す。

【図9】本発明の実施に従って核酸を含む試料溶液から分離精製した核酸の電気泳動の結果を示す。

【符号の説明】

【0244】

- 1 自動装置
- 2 装置本体
- 3 搭載機構
- 4 加圧エア供給機構
- 5 分注機構
- 6 ラック
- 11 核酸分離精製カートリッジ
- 11b 核酸吸着性多孔性膜
- 12 廃液容器
- 13 回収容器
- 40 加圧ヘッド
- 41 エアノズル
- 43 エアポンプ
- 45 開閉バルブ
- 46 圧力センサ
- 49 押えピン（位置決め手段）
- 50 ノズル移動台
- 51w, 51r 分注ノズル
- 52w, 52r 供給ポンプ
- 56w, 56r ボトル
- 61 スタンド
- 62 カートリッジホルダー
- 63 容器ホルダー
- S 試料液
- W 洗浄液
- R 回収液

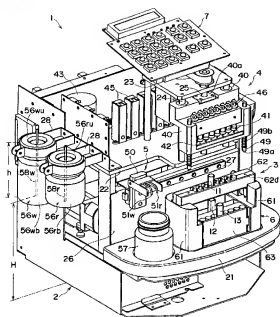
10

20

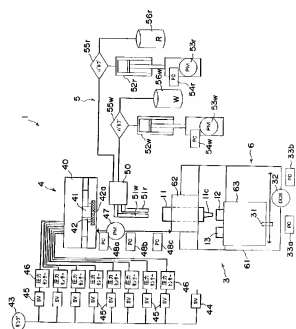
30

40

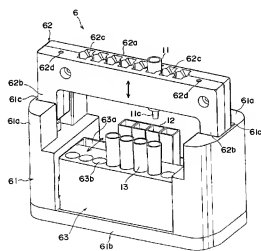
【図 1】



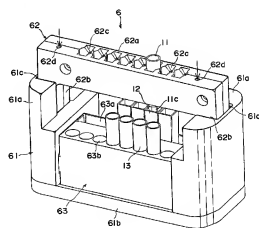
【図 2】



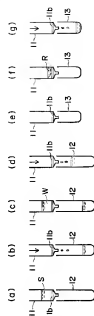
【図 3】



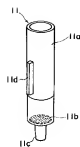
【図 4】



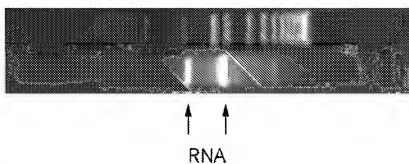
【图 5】



【图 6】



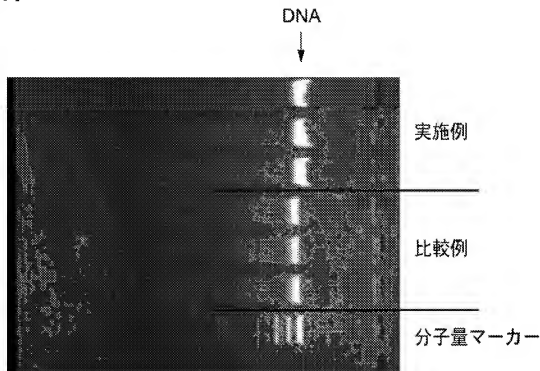
【圖 7】



【图 8】



【図 9】



【手続補正書】

【提出日】平成16年12月1日(2004. 12. 1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項6】

空隙率が50～95%であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

6. 空隙率が50～95%であることを特徴とする上記第1～5項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

7. バブルポイントが $0.1 \sim 10 \text{ kgf/cm}^2$ であることを特徴とする上記第1～6項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

8. 圧力損失が $0.1 \sim 100 \text{ kPa}$ であることを特徴とする上記第1～7項のいずれかに記載の核酸吸着性多孔性膜。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

C 1 2 M 1/00

F I

C 1 2 M 1/00

A

テーマコード (参考)

(72)発明者 牧野 快彦

埼玉県朝霞市泉水3丁目1番4号 富士写真フイルム株式会社内

(72)発明者 森 寿弘

埼玉県朝霞市泉水3丁目1番4号 富士写真フイルム株式会社内

(72)発明者 境野 佳樹

埼玉県朝霞市泉水3丁目1番4号 富士写真フイルム株式会社内

F ターム(参考) 4E024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA11 HA20

4E029 AA23 BB20 CC01

4D06 GA07 HA41 JA71 MA03 MA06 MA22 MA24 MA26 MA31 MA40

MB02 MB14 MC18X NA16 PA03 PB12 PB70 PC11

4D066 AC02B AE05B BA03 BA23 BA24 BA25 EA20 FA07